

Aus dem Institut für Tierernährung
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. H. Brune

Ein Beitrag
zur Kenntnis der Keratine der Haare,
Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden
und deren Rolle
bei der Enthaarung von Tierhäuten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Tuncay Yakalı
aus Izmir
geboren in Akhisar/Türkei

Gießen 1970

1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026



Die vorliegende Arbeit wurde am

I n s t i t u t f ü r
M a k r o m o l e k u l a r e C h e m i e
Abt. Eiweiß und Leder

der Technischen Hochschule Darmstadt unter der Anleitung
von Herrn Prof. Dr. E. H e i d e m a n n ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. E. Heidemann,
danke ich herzlich für die mir gewährte Unterstützung
und die Anleitung bei meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Brune und der Landwirtschaftlichen
Fakultät der Justus Liebig-Universität Gießen danke ich
dafür, daß sie mir in Zusammenarbeit mit dem Institut
für Makromolekulare Chemie - Abt. Eiweiß und Leder -
der TH Darmstadt ermöglichten zu promovieren.

Ferner danke ich Frau G. Friedrich-Sommer für die Aus-
führung der Einzelbestimmungen, Frl. H. Kröll für die
Ausführung der Aminosäureanalysen, Herrn CP. Wolframm
für die Hilfe bei der Korrektur der Arbeit und allen
anderen Institutsangehörigen, die durch ihre Hilfe zum
Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst danke ich
für die finanzielle Unterstützung während meiner
Promotion.

Vervielfältigt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen
Austauschdienstes.

Aus dem Institut für Tierernährung
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. H. Brune

Ein Beitrag
zur Kenntnis der Keratine der Haare,
Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden
und deren Rolle
bei der Enthaarung von Tierhäuten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Tuncay Yakalı

aus Izmir
geboren in Akhisar/Türkei

Gießen 1970

Aus dem Institut für Tierernährung
an der Universität Gießen
Dekan: Professor Dr. H. Brune

Ein Beitrag zur Kenntnis der Vorgänge der Haare, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden und deren Rolle bei der Ernährung von Tieren

INAGURAL-DISSERTATION

Dekan: Professor Dr.R.Waßmuth

1.Berichterstatter: Professor Dr.H.Brune

2.Berichterstatter: Professor Dr.R.Waßmuth

Tag der mündlichen Prüfung: 25.März 1971

Gießen 1971

Inhaltsverzeichnis

A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Problemstellung</u>	16
C. <u>Hauptteil</u>	18
I. Versuche zum Inlösungbringen von Kalbshaaren	18
1. Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Reaktion (Kinetik)	20
2. Untersuchung der Zeitabhängigkeit bei Kombinationen von je zwei verschiedenen Enthaarungsmitteln	22
3. Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Auflösung	25
4. Weitere Einzelversuche	29
II. Methoden zur Gewinnung von Haarwurzel- und Haarwurzelscheidenproteinen	34
III. Untersuchung der Auflösbarkeit von Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden	41
IV. Bestimmung von Einzelkomponenten aus Haaren, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden	43
1. Bestimmung von Lanthionin und Cystin	43
2. Bestimmung von Zuckern	48
3. Bestimmung von Aminosuckern	49
4. Lipidbestimmung	51
V. Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von unbehandelten und behandelten Keratinsubstanzen	53
1. Aminosäureanalyse	53
2. Nachweis von Hexosaminen	63

3. Nachweis von Cystathionin	65
4. Bestimmung der Nichtproteine in Haarwurzel- scheiden, -wurzeln und Haaren	66
VI. Untersuchung der SCMK-Proteine von Haar, Haar- wurzeln und Wurzelscheiden	
1. Gewinnung der SCMK-Proteine	71
2. Diskelektrophorese der SCMK-Proteine	74
3. Aminosäureanalyse des SCMK-Anteils	82
4. Vorversuche zur Auftrennung von SCMK-A- Proteinen	85
5. Trennung der SCMK-Proteine an DEAE-Cellulose	93
D. <u>Zusammenfassung und abschliessende Diskussion</u>	105
E. <u>Experimenteller Teil</u>	
I. Gewinnung der Ausgangssubstanzen	114
II. Auflösungsversuche mit Haaren, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden	115
1. Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Reaktion	115
1.1. Auflösen	115
1.2. Rückstandsbestimmung	116
1.3. Bestimmung des löslichen Anteils	116
2. Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Reaktion bei Kombination von zwei verschiedenen Ent- haarungsmitteln	116
2.1. Auflösen	117
2.2. Rückstandsbestimmung	117
3. Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Reaktion	117

III. Bestimmung von Einzelkomponenten in Haaren, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden	118
1. Bestimmung von Lanthionin und Cystin nach der Methode von Dowling und Crewter	118
2. Bestimmung von Zucker nach der Anthronmethode	120
3. Glucosaminbestimmung	120
4. Lipidbestimmung	121
IV. Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung	122
1. Hydrolyse	122
2. Dünnschichtchromatographische Trennung der Aminosäuren	122
3. Ausführung der quantitativen Aminosäureanalyse	122
V. Gewinnung der SCMKA-Proteine	123
VI. Ausführung der Diskelektrophorese	124
VII. Trennung der SCMKA-Proteine an DEAE-Cellulose	126
F. <u>Kurzzusammenfassung</u>	128

A. Einleitung

Vom volkswirtschaftlichen Standpunkt aus gesehen besitzen zwei Faserproteine eine besondere Bedeutung: das Kollagen und das Keratin. Das Kollagen ist der Hauptbestandteil der Haut, der Sehnen, Knochen und Zähne und bildet den Grundstoff für die Leder- und Gelatineerzeugung. Das Keratin ist der Grundstoff von Federn, Haaren und Wolle und ist auch heute noch ein ganz wesentlicher Textilrohstoff. Wegen dieser Bedeutung zeigte man auch schon bald ein erhebliches Interesse, die Chemie dieser beiden Faserproteine kennenzulernen. Die Struktur und der chemische Aufbau des Kollagens, speziell im molekularen Bereich, sind heute schon viel weiter aufgeklärt als die des Keratins [1,2,3]. Das Kollagen ist ein sehr beliebtes Forschungsobjekt, was es vor allem auch dem grossen medizinischen Interesse verdankt.

Viel weniger Beachtung hat die Erforschung der Struktur und der Chemie des Keratins gefunden. Schwerpunktmässig am bedeutendsten ist die Wollforschung, die besonders vom internationalen Wollsekretariat im C.S.I.R.O. gefördert wird. Es sind zu nennen die Forschungsstätten in Australien, in England und das Deutsche Wollforschungsinstitut in Aachen. Aber auch die Gerbereichemie beschäftigte sich schon wiederholt mit der Struktur und der Chemie der Keratine. Das Hauptinteresse gilt den Prozessen der Enthaarung. So stellt eine gute Enthaarung noch heute den ersten wichtigsten Schritt der Ledererzeugung dar. Aber auch die Erhaltung der Haare, die Vermeidung einer Haarlockerung bei Rohhäuten und vor allen Dingen bei Pelztierfellen ist ein Problem, mit dem sich die der Gerbereichemie eng verwandte Pelzzurichtungstechnik beschäftigt. Konserviert man nämlich eine tierische Haut nicht sehr bald nach dem Abzug vom Tierkörper, so setzen autolytische und bakterielle Prozesse ein, die zu einer Haarlockerung und einem Ausfall der Haare führen. Derartige autolytische Prozesse ergreifen auch die eigentliche Lederhaut und mindern die Lederqualität. Besonders ausgeprägt ist der Schaden jedoch bei hochwertigen Pelzfellen. Dieser autolytische Haarlockerungsprozeß wurde in der Frühzeit der Lederbearbeitung direkt als Methode zur Enthaarung angewendet. Man

mußte dabei freilich eine Schädigung der Ledersubstanz in Kauf nehmen. Später wurde diese Enthaarungsmethode ersetzt durch Verwendung alkalischer Agenzien, wie z.B. Pottasche und gelöschtem Kalk, woher sich der Name des Äscherns ableitete. Etwa um das Jahr 1850 führte man die Verwendung von Natriumsulfid zur Lockerung der Haare ein. Um die Jahrhundertwende begann man auch, mit Hilfe von Enzymgemischen, die von den Gerbern zunächst zur Beize von Handschuhleder benutzt wurden, die Haare zu lockern. So entwickelte O. Röhm [4] ein technisches Enthaarungsmittel auf Enzymgrundlage. In den 30er Jahren begann man in den USA die haarlockernde Wirkung des Dimethylamins zu erkennen, zunächst in Kombination mit Kalk und Natriumsulfid und später in Kombination mit Natronlauge [5]. In jüngster Zeit wurde das Problem der Enthaarung wieder außerordentlich aktuell, nachdem Vorschläge unterbreitet wurden, die Haare mit Chlordioxid, Peressigsäure, Natriumperoxid oder Natriumborhydrid zu entfernen [6,7].

Die chemischen Grundlagen dieser Haarlockerungs- bzw. Haarzerstörungsprozesse sind nur zu einem Teil geklärt. Die vorliegende Arbeit dient der Vertiefung der Erkenntnisse der vielfältigen Zusammenhänge.

Dem Studium der chemischen Reaktivität der Keratinsubstanz sowie der Prozesse der Haarlockerung hat man eine Übersicht über die histologischen und stofflich-chemischen Kenntnisse des Keratins voranzustellen.

Aus Keratin bestehen die Haare und die Epidermis, sowie Klauen, Federn, Hufe, Nägel, die Schwielen der menschlichen Hand, die Lippen des Rindes, um nur einige Vorkommen zu nennen. Sie sind alle als typische Wachstumserzeugnisse der Epidermis, die ja die kollagene Hautsubstanz des Säugetierorganismus außen umkleidet, aufzufassen. Man hat also einen Differenzierungsprozeß im Laufe des Wachstums und im Laufe der Biogenese vor sich. Die Unterschiede bei den einzelnen Keratinen sind sowohl mit dem bloßen Auge als auch mit dem Mikroskop erkennbar. Die Aminosäurezusammensetzung - um nur ein Beispiel aus dem molekularen Bereich anzuführen - ist auch bei allen diesen Keratinerscheinungsformen unterschiedlich.

Keratin ist eine intrazelluläre Substanz. Sie zeichnet sich besonders dadurch aus, daß die Keratinzellen in ihrem Wachstumsprozeß eine Veränderung im Sinne einer zunehmenden Verhornung durchlaufen. Das bedeutet, daß an einer bestimmten Zone fortlaufend Keratinzellen gebildet und immer weiter zur Peripherie hin geschoben werden. So wird das Haar von der Haarcuticula und die Epidermis von der Epidermiscuticula umkleidet, welche aus schuppenförmigen Zellen bestehen, die äußerlich keinerlei Ähnlichkeit mehr mit den basalen Zellen besitzen, aus denen sie einst hervorgegangen sind. Beim Haarwachstum von der Wurzel zur Spitze hin haben ähnliche Erscheinungen, indem aus einer zunächst weichen, wenig vernetzten Substanz im Laufe eines Keratinisierungsprozesses die hochvernetzte, mechanisch außerordentlich widerstandsfähige Haarsubstanz entsteht.

Den Aufbau des Haares erkennt man in der Abb. 1, in der ein schematischer Längsschnitt durch ein Haarfollikel wiedergegeben wird.

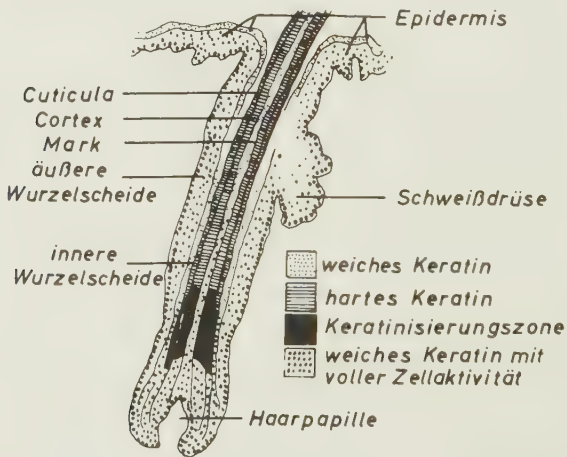


Abb. 1: Schematischer Längsschnitt durch einen Haarfollikel
(nach Leblond; New York)

In einer Einstülpung der Lederhaut, dem Haarbalg, ist das Haar eingebettet und verankert. Der Haarbalg ist mit einer weichen keratinösen Substanz, der "Äußeren Haarwurzelscheide", ausgekleidet,

die als Fortsetzung der Epidermis aufzufassen ist. Die Äußere Wurzelscheide umschließt eine weitere Schicht, die "Innere Wurzelscheide".

Im unteren Teil der Haarwurzel verwischt sich die Differenzierung zwischen Wurzelscheide und den Ursprungszellen des Haares. Diese Zellen entstehen offenbar in einer zwiebelartigen Einstülpung des Haarbalgs, der Haarpapille, an deren Peripherie fortlaufend neue Zellen gebildet und aus dem Haarbalg herausgedrängt werden. Auf der Abbildung (1) erkennt man, daß das Haar innen eine Markzone enthält, die ebenfalls aus weichem Keratin besteht. Schon bald oberhalb der Haarpapille beginnt ein Keratinisierungsprozeß, der allerspätstens abgeschlossen ist, wenn das Haar die Oberfläche der Haut erreicht hat.

Des weiteren erkennt man, daß das Haar von innen nach außen aus drei Zonen aufgebaut ist: dem schon erwähnten Haarmark, der Cortexschicht, die die Hauptmasse der Haarsubstanz ausmacht und die dem Haar die gesamte Struktur und Stabilität verleiht, und einer dünnen Auflagenschicht, die Haarcuticula genannt wird.

Im Unterschied zum Haar, kann die Epidermis nur formal als aus mehreren Schichten aufgebaut gedacht werden, weil die Übergänge von einer Schicht zur nächsten fließend sind. So bezeichnet man die basale Zellschicht auch als STRATUM GERMINATIVUM, die darauf aufliegenden Schichten als STRATUM SPINOSUM und STRATUM GRANULOSUM. Die im Laufe der mechanischen Beanspruchung fortlaufend abgestoßene oberste Schicht nennt man STRATUM CORNEUM.

Wie schon ausgeführt, ist der Cortex der Hauptbestandteil des Haares. Das Mark (Medulla) nimmt wenige Prozente ein. Der Cortex ist aus langen Spindelzellen, den Cortexzellen aufgebaut, bei denen man zwei Typen unterscheidet: die Ortho- und die Para-Cortexzellen. Sie sind so angeordnet, daß die Ortho-Cortexzellen die eine und die Para-Cortexzellen die andere Hälfte des Haares einnehmen. (Siehe Abb. 2)

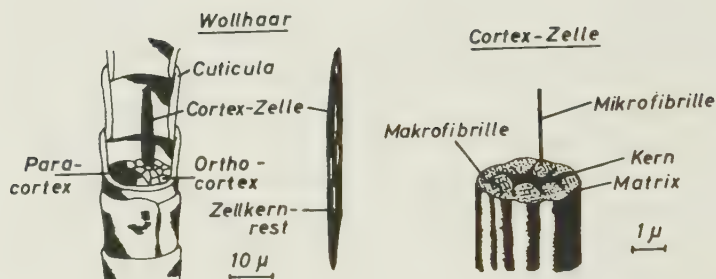


Abb. 2: Schematischer Aufbau der Cortexzelle des Haares
(nach Ullmann, München)

Es handelt sich dabei häufig strukturell und auch chemisch um verschiedene Substanzen. Sie haben als Folge ihrer unterschiedlichen Morphologie verschiedene mechanische Eigenschaften und bewirken die Kräuselung des Haares, besonders die der Wolle. Die Cortexzellen sind etwa 50 µ lang und an ihrer dicksten Stelle etwa 3 µ breit. Sie sind aus zahlreichen Makrofibrillen aufgebaut, was sich bei der Betrachtung unter dem Mikroskop zeigt. Eine weitere Unterteilung ist mikroskopisch nicht mehr zu erkennen. Wohl aber erkennt man, daß zwischen den Makrofibrillen eine offenbar anders strukturierte Substanz eingelagert ist. Es ist dies die Matrix. Es ist ein dominierendes Merkmal des Keratins, daß es zweiphasig aufgebaut ist. Das bedeutet, diese Proteinsubstanz besteht aus faserförmig strukturierten Einheiten, die in eine amorphe Substanz (Matrix) quasi eingebettet sind. Diese Matrixsubstanz schließt aber offenbar nicht nur die Makrofibrillen innerhalb der Cortexzellen ein, sondern verteilt sich auch zwischen den weiteren Unter-

Die Makrofibrille der Cortexzelle besteht wiederum aus einer Vielzahl von Mikrofibrillen, deren Durchmesser etwa 80 Å und deren Länge mehrere 1000 Å beträgt. Die Mikrofibrille ihrerseits ist, wie man speziell aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennen kann (siehe Abb. 3) aus 9 + 2 Protofibrillen, die charakteristisch angeordnet sind (siehe Abb. 4). Vermutlich sind auch die Protofibrillen in Matrix eingebettet.

Aus Untersuchungen der Dichte und der Raumerfüllung schließt man, daß sich eine Protofibrille aus drei α -Helices aufbaut (siehe Abb. 5).

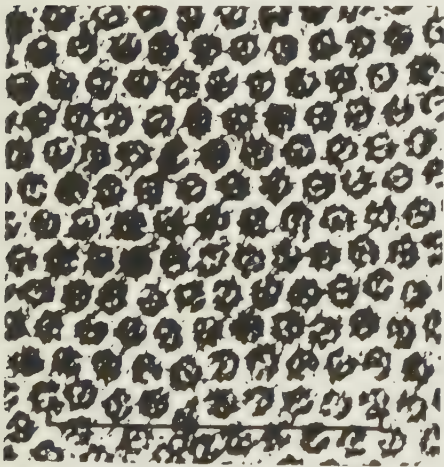


Abb. 3: Protofibrilläre Substruktur der Mikrofibrille

(B.K. Filshie und G.E. Rogers, J.Mol.Biol., 3 784 (1961))

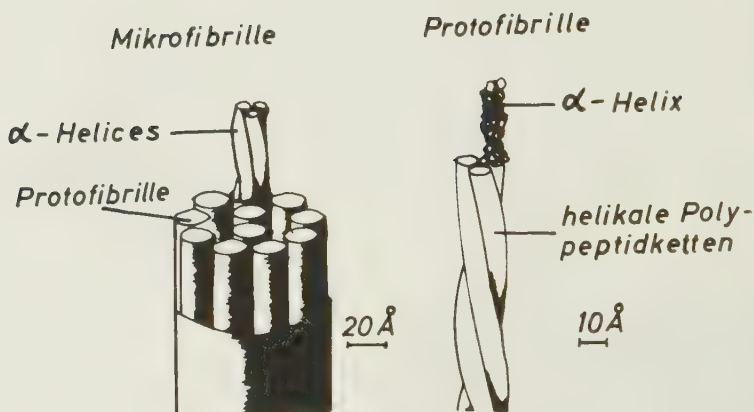


Abb. 4, 5: Schematischer Aufbau der Mikrofibrillen und Protofibrillen

Schon Anfang der 30er Jahre stellte Astbury [8] fest, daß Keratin ein charakteristisches Röntgendiagramm aufweist. Er nannte es α -Keratin. Im Laufe der Jahre wurde immer klarer, daß hier ein ganz grundlegendes Strukturelement vorliegen muß. So kennt man seit 1950, seit den Untersuchungen von Pauling, die α -Helix, die der Grundbaustein des α -Keratins ist. Demgegenüber zeigt die Matrix keine Röntgenstruktur. Das α -Keratin kann aber durch mechanische Beanspruchung in eine β -Struktur - erkennbar an einer grundlegenden Veränderung des Röntgendiagramms - übergehen. Die Bezeichnung " β -Struktur" wurde später ganz allgemein in der Proteinchemie für Proteine mit gleicher Struktur angewendet, vergleiche z.B. Chymotrypsin. Für das β -Keratin haben Pauling und Corey [9] Faltblattstrukturmodelle entwickelt, die neuerdings auch von Fraser und Mitarbeitern [10] durch Röntgenstrukturanalyse und Infrarotdaten bestätigt werden konnten.

Während man bisher die Ansicht vertrat, daß das β -Keratin nur in veränderter Wolle vorkommt, sollen nach neueren röntgenografischen,

elektronenmikroskopischen und mechanischen Untersuchungen auch schon im natürlichen Wollkeratin die α -Helices innerhalb der Protofibrillen mit β -Strukturanteilen abwechseln. Die Periodizität längs der Protofibrille soll ca. 66 Å betragen [11].

Die Feinstruktur der Protofibrille bzw. der Mikrofibrille ist auch heute noch nicht völlig geklärt. Nach neueren Untersuchungen sollen nämlich beim α -Keratin 5 α -Helices 1 Protofibrille und 5 Protofibrillen 1 Mikrofibrille bilden [12]. Nach Fraser und Mitarbeiter. [13] besteht die Mikrofibrille des α -Keratins aus einem Ring, in dem kurze Einheiten stark gewundener α -Helices in regelmäßiger Form vorliegen.

Von ganz entscheidender Bedeutung ist die Aminosäure Cystein bzw. die "Doppelaminosäure" Cystin für den Aufbau des Keratins. Ihr Anteil in der Wolle beträgt etwa 5-10 %. Die Wolle verdankt ihre mechanischen Eigenschaften nicht nur der Struktur der faserigen Elemente, wie den α -Helices, sondern vor allem auch den Querbrücken, die durch das Cystin gebildet werden. Es ist auffällig, daß die strukturierten helikalen Anteile des Keratins einen niedrigeren und die unstrukturierten Matrixanteile dagegen einen sehr viel höheren Cystinanteil besitzen. Eine wichtige Erkenntnis ist ferner, daß in den weichen, unkeratinisierten Zonen des Haares der Schwefel in Form von Cystein vorliegt, während im Laufe der Keratinisierung diese Schwefelbrücken zu Cystin geschlossen werden. Die Anzahl der Querbrücken ist ein Maß für die mechanische Festigkeit. So stellt die Festimmung des Verhältnisses von Cystin und Cystein eine wichtige Methode der Keratinchemie dar. So konnte durch diese Bestimmung eine Verzögerung der Disulfidbrückenbildung bei schnellem Wachstum beobachtet werden, desgleichen eine Veränderung des Verhältnisses beim Übergang von α -Keratin in β -Keratin bei der Superkontraktion.

Diese Feststellungen sind aber in jüngster Zeit wieder in Frage gestellt. Es ergibt sich hier die Notwendigkeit, einige nähere Ausführungen über den Mechanismus der Superkontraktion zu machen. Schon Anfang der 30er Jahre haben Speakman [14] und auch Astbury [8] festgestellt, daß eine Wollfaser bei 50 oder 60° C in Wasser längere Zeit unter Dehnung gehalten und anschließend nach Herausnehmen aus dem Wasser entspannt und kurze Zeit auf 100° erhitzt,

einer außerordentlich starken Verkürzung unterliegt, die so weit geht, daß die Wollfaser nur noch etwa 30 % der ursprünglichen Länge besitzt. Die Superkontraktion kann durch Dehnen im kochenden Wasser wieder rückgängig gemacht werden. Superkontraktion findet auch statt, wenn man Wollfasern unter Dehnung in Lösungen von 1 n Natronlauge in Peressigsäure, höher konzentrierter Lithiumbromidlösungen oder anderen Hydrotropika, wie z.B. Lösungen von Zinkchlorid, Kupfer- Aminkomplexen, Quecksilber- oder Silbersalzen, aufbewahrt. Die Superkontraktion ist zum Teil reversibel, wenn die Salze ausgewaschen werden.

Inkubiert man eine Wollfaser in gedehntem Zustand bei 100° C etwa zwei Stunden, läßt sie dann entspannen und taucht sie erneut kurz in siedendes Wasser, so wird sie nicht mehr superkontrahieren. Bei der Superkontraktion findet offenbar eine Zerstörung der α -helikalen Struktur in dem Sinne einer Helix-Knäuel-Umwandlung statt, wie wir das von anderen Proteinen bei der Behandlung mit hydrotropen Mitteln oder bei der Einwirkung von Wärme kennen. Die Disulfidbindungen werden dabei nur bedingt verändert.

Dies geht auch aus neueren Versuchen von G. Crewter und Mitarbeitern [15] aus dem Jahre 1967 hervor, die Wolle auf 3 verschiedene Arten quervernetzten. Einmal durch den Einbau von Methylenbrücken zwischen die Cystin-Schwefelatome, zum anderen durch Lanthioninbrücken und zum dritten durch Bildung von Lysinoalaninbrücken. Sie fanden, daß derartig "gegerbtes" Keratin nur noch eine verminderte Superkontraktion zeigte. Diese Arbeit ist aber insofern noch von großer Bedeutung, als in ihr für die Superkontraktion zwei verschiedene Stufen festgestellt wurden, je nachdem, ob man die Superkontraktion in 6 m oder 4 m Lithiumbromidlösung herbeiführte. Bei Anwendung der höher konzentrierten Lithiumbromidlösung beobachteten die Autoren nämlich, daß eine weitere Verkürzung eintrat, die offenbar auf eine strukturelle Umwandlung der Matrixanteile des Proteins im Sinne einer Entfaltung der Ketten auftrat. Diese Theorie macht die ältere Vorstellung, daß es bei der Superkontraktion zu einem Thiol-Disulfidaustausch kommen muß, überflüssig.

Aus dem Verhalten des Keratins bei der Superkontraktion schloß man gleichfalls, daß sogenannte "diskrete Bereiche" parallel oder fast parallel angeordneter α -helikaler Polypeptidketten vorliegen

müßten. Diese α -helikalen Bereiche sind in bestimmten Intervallen miteinander durch Disulfidbrücken oder auch durch säurelabile kovalente Brückenbindungen verbunden. In gleicher Weise existieren auch Disulfid- oder säurelabile kovalente Bindungen zur Matrix hin [16,17]. Schon in früheren Arbeiten wurde geschlossen, daß die Matrix eine plastische Verformbarkeit besitzt, ursprünglich aber eine quasi geordnete Struktur hat, die durch eine Vielzahl von Disulfidbrücken stabilisiert wird. Auch Wasserstoffbrückenbindungen sollen hierbei eine Rolle spielen.

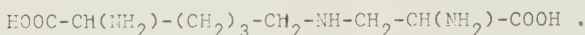
Wie aus all dem hervorgeht, kommt dem Übergang von Cystein zu Cystin eine dominierende Rolle in der Reaktivität der Keratine zu. Dieser Oxydationsvorgang ist ein sehr komplex verlaufender Prozeß. Nach Untersuchung von Maclaren, Leach und Swan [18] wird durch Oxydation die Disulfidbrücke aus Vorprodukten verschiedener Oxydationsstufen infolge Disproportionierung gebildet. Eine geringere Rolle spielen in der Reaktivität die salzartigen und die Wasserstoffbrücken. In neuerer Zeit werden ebenfalls esterähnliche Bindungen angenommen (vgl. hierzu Versuche von Herrn Petermann [19]).

Eine schon sehr lange bekannte Reaktion des Keratins ist seine Immunisierung [20,21,22,23]. Keratinproteine zeigen nämlich nach Alkaliwirkung eine verminderte Reaktionsfähigkeit gegenüber Sulfiden. Die Ursache hierfür soll die durch Alkali gebildete Thioätherbrücke des Lanthionins sein, die aus der Disulfidbrücke des Cystins durch S-Eliminierung entstanden sein soll. Dadurch soll das Keratin seine Reaktivität verlieren.

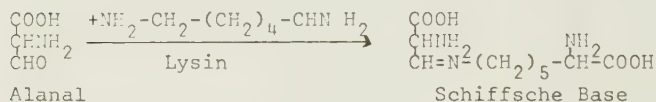
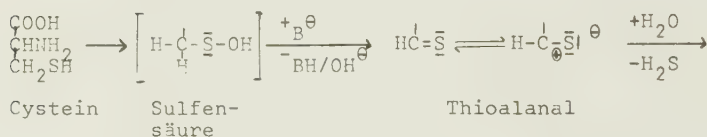
Ursprünglich haben Speakman und Schöberl [24,25] eine hydrolytische Spaltung der Disulfidbrücke unter Bildung einer Sulfensäure und eines Thiols angenommen. Die Sulfensäure soll dann unter Abspaltung von Schwefel und H_2O in die α -Aminoacrylsäure übergehen, die nachweisbar ist. Die α -Aminoacrylsäure kann dann mit einem Thiol zu Lanthionin reagieren [22].

Nach Mellet [26] verläuft die Lanthioninbildung in zwei Phasen. In der ersten Phase werden etwa 75 % der Disulfidbrücken in Gegenwart von Lithiumbromid und 0,7 m Kaliumcarbonat bei 50° innerhalb 32 Stunden zur Reaktion gebracht. Die zweite Phase erfordert drastischere Bedingungen.

Die von Cuthbertson und Philipps [22] nachgewiesene α -Aminoacrylsäure kann auch nach Mellet [26] aus Serinresten entstehen. Es gibt noch ein anderes Reaktionsprodukt, nämlich das Lysinoalanin



Dieses kann ebenfalls aus α -Aminoacrylsäure oder, wie man auch sagt, Dehydroalanin, entstehen, das sich mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins umsetzt. Das Lysinoalanin kann auch dadurch entstehen, daß sich die Sulfensäure durch H_2S -Austritt und Anlagerung von H_2O zum Alanal, d.h. α -Aldehyd des Alanins, umlagert und sich dieses mit der Aminogruppe des Lysins unter Bildung einer Schiff'schen Base verbindet:



Die Beobachtungen von Mellet werden auch von Miro, Dominquez und Parra [27] bestätigt, die Keratin mit Natronlauge behandelten. Im Übrigen entstand hierbei auch Cysteinsäure. Der Verlauf der Reaktion ist somit in zwei Richtungen möglich: einmal über die β -Eliminierung zu den Endprodukten Lanthionin und Lysinoalanin und zum anderen durch Weiteroxydation zur Cysteinsäure.

Häufig untersucht wurde das Problem unter welchen Bedingungen sich Keratin in Lösung bringen läßt. Dies gelingt nicht allein durch eine Aufspaltung der Disulfidbrücken mit einem reduzierenden Agens. Gleichzeitig muß auch eine Denaturierung des Faserproteins mit wasserstoffbrückensprengenden Mitteln, wie Harnstoff, Lithiumchlorid, Rhodanid oder anderen stattfinden. Die Methoden zur Gewinnung des löslichen Keratins sind folgende:

1. Reduktion
2. Sulfitolyse
3. Oxydation
4. saure Hydrolyse
5. enzymatische Behandlung

Die Reduktionsmethode wurde erstmals im Jahre 1934 von Goddard und Michaelis [28] vorgeschlagen und 1953 von Gillespie und Lennox [29] verbessert. Dabei wird das unlösliche Keratin durch Reduktion der Disulfidbrücken aufgespalten:

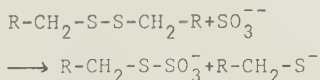


Man nennt diese Reaktion auch einen Disulfidaustausch. Hierzu kann man z.B. Kaliumthioglykolat oder Thiophenol verwenden. Gleichzeitig muß dabei die Rekombination der SH-Verbindungen verhindert werden, die sehr schnell in Gegenwart von Luftsauerstoff verläuft. Zur Verhinderung der Rekombination wird die Thiolgruppe mit Jodessigsäure bei pH 8 alkyliert.



Die an der Thiolgruppe alkylierten Spaltprodukte des Keratins nennt man S-Carboxymethylkeratine oder abgekürzt SCMK-Verbindungen. Je nach Reaktionsbedingungen erhält man bei der Reduktion mit Thioglykolat und anschließender Carboxymethylierung einmal schwefelärmere und zum anderen schwefelreichere SCM-Keratine. Bei milden Bedingungen, bei denen hauptsächlich die Keratine der Matrix in Lösung gehen, erhält man eine schwefelreiche Fraktion, die SCMK B genannt wird. Unter härteren Bedingungen, bei denen das Keratin gleichzeitig denaturiert wird, gehen auch die schwefelarmen, ursprünglich fibrillären Anteile in Lösung und man erhält dadurch eine schwefelärmere Keratinfraktion, die SCMK A. Es sind vielfältige Bemühungen zur weiteren Trennung der SCMK A und B in Unterfraktionen angestellt worden, wobei man sich der Molekularsieb- und der Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose sowie der Stärkegelelektrophorese bediente.

Auch durch Sulfitolyse kann Keratin als S-Sulfokeratein in Lösung gebracht werden. Dazu behandelt man z.B. Federn oder Wolle 18 Stunden bei 40° mit einer 0,3 m Natriumbisulfit-, 10 m Harnstofflösung und gewinnt dadurch aus Federn etwa 80 % des Proteins, aus Wolle etwa 50 %. Die Reaktion verläuft folgendermaßen:

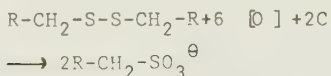


Eine effektvollere Variante ist die oxydative Sulfitolyse, wobei man mit Natriumbisulfit und Kupfer-II-Salzen arbeitet. Als Oxyda-

tionsmittel wirkt Tetrathionat oder Luftsauerstoff. Es entstehen ebenfalls Sulfokeratine, die im schwach alkalischen Medium extrahierbar sind. Vor der Auftrennung der Sulfokeratine müssen allerdings die Kupfersalze restlos entfernt werden. Durch die Sulfitolyse kann man die Ortho- und Para-Cortexzellen getrennt auflösen; die Ortho-Cortexzellen bei pH 3, die Para-Cortexzellen bei pH-Werten zwischen 3,25 und 5. Die Proteine der Para-Cortexzellen haben einen etwas niedrigeren Cystingehalt.

Die unterschiedliche Reaktivität kann nach Miro und Hueso [30] auf verschiedene Verbrückung und Verteilung von inter- und intramolekularen Vernetzungen zurückgeführt werden. Technisch hat die Sulfitolyse keine Bedeutung für ein in Lösungbringen des Keratins, z.B. zur Enthaarung, wohl aber kann man damit die Wolle unter milderen Bedingungen für eine Färbung oder auch für eine Dauerbügelfalte aufschließen. Das beruht darauf, daß nur ein Teil der S-S-Brücken in SH- und SO_3^- -Gruppen umgewandelt wird.

Alexander und Earland [31] brachten 1950 erstmals Wolle durch Oxydation der Disulfidbindung mit Perameisensäure bzw. Peressigsäure und nachfolgende Extraktion mit Ammoniak in Lösung. Hierbei entsteht eine Keratinsulfosäure:



Man nennt diese Verbindungen auch Keratosen. Man unterscheidet laut nachfolgender Tabelle 1 α -, β - und γ -Keratosen, wobei die α -Keratosen wenig Schwefel die γ -Keratosen mehr Schwefel enthalten, also aus den Matrixkeratinen stammen. Die Herkunft der β -Keratosen ist nicht ganz eindeutig. Die unterschiedlichen Keratosen lassen sich aus dem Gesamtansatz durch fraktionierte Fällung gewinnen. Man nimmt an, daß die oxydative Methode des Inlösungbringens nicht so schonend verläuft wie die reduktive.

Es ist selbstverständlich keine Frage, daß man auch durch eine partielle saure Hydrolyse Keratin in Lösung bringen kann, wie es z.B. Blackburn [32] macht. Durch Behandeln des Keratins mit 2 n Salzsäure bei 45° C gewann er ein lösliches Produkt, das bei der Auftrennung 2 Fraktionen ergab, von denen die eine in der Aminosäure-

Tab. 1: Übersicht über die Eigenschaften und Herkunft der bei Oxydation mit Peressigsäure erhaltenen Keratosen

Keratose	Isolierung	S-Gehalt	Herkunft	Struktur
α -	lösliche Fraktion fällbar im sauren Gebiet	mittel bis gering ca. 1,9 % S	fibrilläre Anteile des Epidermis Keratins "Präkeratin"	α -Helix 20 % An- teil der Wolle
β -	im sauren und al- kalischen Gebiet unlöslich	ca. 2,1 % S	Wahrscheinlich aus den Zellmembranen nach der Keratinisierung	ca. 10 % Anteil der Wolle
γ -	besonders leicht löslich, fällbar nur unvollständig in stark saurem Gebiet	S in den SO_3H -Grup- pen ca. 5,8 % S	z.T. niedermolekular aus der unstrukturierten Matrix	keine α -Helix 30 % An- teil der Wolle

zusammensetzung der α -Keratose, die andere der der β -Keratose entsprach.

Bisher haben wir nur das Inlösungbringen von Haaren besprochen. Jedoch gewinnen im Zusammenhang mit unserer vorliegenden Arbeit die Versuche zum Inlösungbringen von Epidermin bzw. Präkeratin, einer Vorstufe des fibrillären Keratins, besondere Beachtung. Diese Vorstufen der Keratine gewinnt man aus Epidermis, wobei sich besonders die Epidermis der Kuhlippen eignet, weil sie eine hohe Ausbeute an Substanz liefert. So konnte 1964 Matoltzy [33] durch Extraktion mit sauren Citratpuffern ein lösliches Keratin isolieren. 1952 hat Rudall [34] mit 6 m Harnstoff eine Substanz aus Kuhnasen isoliert, die er Epidermin nannte. Diese Substanz konnte zu Fasern ausgezogen werden und ergab ein ausgezeichnetes α -Helixdiagramm, die sich beim Einbringen in 50-60° C warmes Wasser in eine β -Struktur umwandelten.

Diese Substanz kann nur wenige Disulfidbrücken enthalten, weil sie in der Hitze weitgehend denaturiert.

Man fand, daß die oberen Zellschichten der Kuhnasen fibrilläre Substanzen mit einem isoelektrischen Punkt von 5.5 und die unteren Zellschichten weniger fibrilläre Substanzen mit einem isoelektrischen Punkt von 4.5 liefern. Carruthers [35] fand 1955 durch Harnstoffextraktion von Mäuseepidermis noch eine weitere Fraktion mit einem isoelektrischen Punkt von 6.3. 1959 konnte Rogers [36] aus Haarwurzeln mit 6 m Harnstoff bei pH 7 ebenfalls ein Präkeratin lösen, das er zur Vermeidung einer Rekombination mit Jodessigsäure alkylierte. Hierdurch wurde der isoelektrische Punkt etwas mehr ins saure Gebiet verschoben. Er fand 2 Fraktionen, eine mit einem isoelektrischen Punkt von 5.2 und eine weitere mit einem solchen von 3.5. Seine Substanzen mit einem Molekulargewicht von 100 000 geben einen Film mit einem sehr scharfen α -Helix-Diagramm.

Eine sehr interessante Arbeit stammt von Crounse [37], der mit Alkali aus den Schwielen der Hand bei verschiedenem pH lösliche Fraktionen der Epidermis gewann und diese im sauren Gebiet fällte. Er fand Fraktionen bei pH 6.3, 5.5, 5.0 und 4.5 und konnte nachweisen, daß alle diese Fraktionen auf die Fraktion bei pH 6.3 zurückgehen und quasi aus dieser entstanden sein müssen. Er stellte fest, daß die 6.3-Fraktion durch Behandlung mit 0.02 n Natronlauge bei

37° C quantitativ in die Fraktion von pH 5.5 umgewandelt werden kann, die bei weiterer Behandlung mit Natronlauge in die Fraktionen, die bei den niedrigeren pH-Werten ausgefällt werden können, umgewandelt wird.

In der gerbereichemischen Literatur, soweit sie sich mit dem Problem des Inlösungsbringens von Haaren beschäftigt, wurden bisher nur ältere Arbeiten ausgewertet. Auch neuere Untersuchungen dazu vom Gerbereichemischen Institut, Reutlingen, beschäftigen sich ausschließlich mit rein technologischen Fragen.

Wie schon einleitend gesagt, hat im Sulfidäsker das Natriumsulfid technologisch die größte Bedeutung. In einer bedeutsamen Arbeit von H.B. Merrill [38] wurde die haarlockernde Wirkung von Sulfidäschern in Abhängigkeit von deren Ionenkomponenten, nämlich SH^- , S^{--} und OH^- eingehend dargelegt. Das Verhältnis der 3 Ionenarten zueinander ist entscheidend. Die haarlockernde und quellende Wirkung steigt mit steigender Sulfidkonzentration bei konstant gehaltenem pH-Wert und bei konstanter Konzentration wiederum mit steigendem pH-Wert. Das bedeutet, daß man zur Haarzerstörung bzw. Haarlockerung sowohl OH^- -Ionen als auch S^{--} -Ionen benötigt. Ein zu starkes Absinken des pH-Wertes und damit die Bildung von überwiegend SH^- -Ionen führt zu einer Verminderung der Keratolyse. Der Unterschied zwischen Haarlockerung und Haarzerstörung ist eine Frage der Konzentration an Sulfidionen. So z.B. erhält man mit Sulfidkonzentrationen unter 0,2 % vom Hautgewicht keine nennenswerte Zerstörung des Haares, wohl aber noch eine Lockerung. Dies bedeutet, daß offenbar die Verbindungsstellen zwischen Haut und Haar, nämlich die Haarwurzelscheiden, schon sehr viel empfindlicher gegen keratolytisch wirkende Agenzien sind. Diesen Zusammenhang zeigen auch Küntzel und Stirtz in einer mikroskopischen Untersuchung [39], wobei sie die besondere Quellungsempfindlichkeit der Haarwurzelscheide hervorheben und für die Haarlockerung verantwortlich machen. Die besondere Wirkung von häufig benutzten Äschern mag einerseits auf dem hohen Gehalt an SH^- -Gruppen, die als Thiole am Disulfidaustausch teilnehmen, in der Äscherlösung beruhen und zum anderen auf dem Gehalt von aus dem Kollagen abgespaltenen Ammoniak und Aminen. Es ist schon oben festgestellt worden, daß Amine die Haarlockerung erheblich fördern, weshalb man auch häufig Dimethylamin zu Äscherlösungen zusetzt. In einer neueren Untersuchung theoretischer Art zeigte Windus [40], daß die

keratolytische Wirkung des Amins auf einer nukleophilen Substitution der S-S-Brücke beruhen müsse, wobei sich unter anderem SN-Verbindungen bilden müßten. In allerneuester Zeit haben auch Manzo und Mitarbeiter [41] aufgrund von infrarotspektroskopischen Daten auf die Existenz von derartigen SN-Verbindungen hingewiesen. Außerdem ist es aber nicht ausgeschlossen, daß allein durch die Anwesenheit des Alkalis eine Oxydation zu Sulfonsäuren und damit ein Aufbrechen der vernetzenden S-S-Brücken stattfindet.

2. Problemstellung

Aus den einleitenden Ausführungen ist schon deutlich geworden, daß zwei wesentliche Fragen noch einer Lösung harren und deshalb hier in den Mittelpunkt der Arbeit gestellt werden sollen. Die erste Frage ist die, unter welchen Bedingungen gelingt es, eine möglichst haarrestfreie Enthaarung von Häuten, die später zu Leder verarbeitet werden sollen, zu erreichen. Eine derartige haarrestfreie Enthaarung gewinnt dadurch eine besondere Bedeutung, daß immer mehr hellfarbige Anilinleder hergestellt werden, bei denen dunkel pigmentierte Haarreste stören. Eine Erweiterung erhält diese Frage dadurch, daß eine Vielzahl von neueren Enthaarungsverfahren in jüngster Zeit vorgeschlagen wurden, die es noch zu verbessern gilt, denn bisher hat sich noch keines dieser Verfahren durchsetzen können. Das hat zwei Ursachen, einmal an der Unkenntnis des Enthaarungsmechanismus, zum anderen an den Nebenwirkungen, die diese Chemikalien auf das lederbildende Kollagen haben. Letztere Frage soll uns allerdings nicht weiter beschäftigen. Uns interessiert vielmehr grundsätzlich: Gelingt es unter irgendwelchen technologischen Bedingungen überhaupt, das Haarkeratin in Lösung zu bringen, gegebenenfalls durch eine Kombination verschiedener Verfahren, die Frage, von welchen Faktoren hängt ein derartiges Inlösungsgehen ab. Dabei ist der Einfluß von Konzentration, Temperatur, Behandlungszeit und die Kombination verschiedener Verfahren zu untersuchen.

Ein ganz wichtiger Gesichtspunkt ist hierbei die Untersuchung derjenigen Anteile des Haares, die in die Haut eingebettet sind. Gerade diese Keratine dürften sich von den aus der Haut herausragenden Haaranteilen unterscheiden. Hinzu kommt, daß die Epidermis besonderes Interesse verdient.

Die spezifische Wirkung aller Enthaarungskemikalien auf Haarwurzelscheiden, Haarwurzeln und Epidermis ist bisher überhaupt noch

nicht untersucht worden. Dazu bedurfte es zunächst erst einmal einer Methode, um die Haarwurzeln, Haarwurzelscheiden und die Epidermis-keratine in befriedigender Weise zu isolieren.

Die zweite wichtige Frage stellt sich aus dem allgemeinen eiweißchemischen Interesse unserer Arbeitsgruppe im Institut für Makromolekulare Chemie - Abteilung Eiweiß und Leder . Es ist bisher nur in Ansätzen gelungen, einheitliche Keratinbruchstücke zu isolieren. Die vorliegende Ausarbeitung einer Gewinnung von Haarwurzelscheidenproteinen legt es nahe zu versuchen, aus diesen jungfräulichen, präkeratinösen Proteinen einheitliche Bruchstücke zu erhalten. Wir müssen aufgrund der Erfahrungen an Kollagen vermuten, daß auch beim Keratin im Laufe des Alterns weitgehende Veränderungen durch den Einbau von zusätzlichen Vernetzungsstellen als Folge von fotochemischen Reaktionen, Oxidationen und dergleichen auftreten. Dies führt stets zu Heterogenitäten, die bei der Gewinnung einheitlicher Proteinfragmente störend sind. Außerdem erfordert die vielfältige Vernetzung gealterter Eiweiße eine Aufspaltung auch dieser Bindungsstellen, wobei wie bei allen hydrolytischen oder thiolytischen Prozessen stets mit einer gewissen Zerstörungsrate und Hydrolyserate an unspezifischen Stellen zu rechnen ist. Es stellte sich also die Aufgabe, von Haarwurzeln und Haarwurzelscheidenproteinen mit den neuesten Methoden der Proteinisolierung einheitliche Proteinbruchstücke zu gewinnen.

Eine weitere Frage beschäftigt sich mit dem Problem, ob die Melanine bei der Haarzerstörung mitgelöst werden oder nicht. Untersuchungen über Melanine sind in der gerbereichemischen Literatur bisher überhaupt noch nicht veröffentlicht. Die Melaninforschung ist, wie erste Literaturstudien quasi ergaben, noch ein Stiefkind der Naturstoffforschung, was offenbar auf die außerordentlichen Schwierigkeiten zurückzuführen ist, denen man hierbei begegnet.

C. Hauptteil

I. Versuche zum Inlösungsbringen von Kalbshaaren

Wie schon einleitend festgestellt wurde, stellte sich uns als erstes Problem die systematische Untersuchung der Auflösbarkeit von Haarkeratinen in verschiedenen oxydativen und reduktiven Chemikalien. Da ja die Untersuchung der Auflösbarkeit von Epidermis, Haarwurzeln und Haarwurzelscheidenproteinen dadurch erschwert ist, daß diese Keratinarten nur unter erheblichem Aufwand und in relativ kleinen Mengen gewonnen werden können, begannen wir unsere Untersuchungen mit den in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehenden Haaren von Kalbshaut, die leicht von der Haut geschoren und gereinigt werden können. Nach Trocknung steht eine genau einwiegbare Substanz zur Verfügung, und man hat auch keine Schwierigkeiten, weiße und schwarze Haare getrennt zu gewinnen und zu untersuchen.

Vorausschickend sollen die Bedingungen angegeben werden, bei denen in der Praxis der Lederfabrikation Enthaarungen vorgenommen werden. Das am meisten verwendete Enthaarungsmittel in der Lederfabrikation ist das Schwefelnatrium (60 - 66 %ig), von dem etwa 1 - 4 % bezogen auf das Gewicht der Rohhaut in 2 - 4 Liter Flotte pro 1 kg Haut angewendet werden. Bei der Konzentration von 1 % Schwefelnatrium, also 10 g pro 1 kg nasse Haut, erhält man nur eine Haarlockung, bei der Anwendung von 40 g, also 4 %, erhält man dagegen eine Haarzerstörung innerhalb von wenigen Stunden.

Wie groß ist aber der Keratinanteil der Haut? Er schwankt grundsätzlich ganz erheblich mit dem Haarvolumen, das sich auf der Haut befindet. Der Haaranteil ist sehr viel größer bei Kalbs-, Ziegen- und Schafhäuten als bei Rindshäuten. Der prozentuelle Epidermisanteil dürfte ebenfalls bei Rindshäuten kleiner sein als bei Kalbshäuten.

100 cm² Kalbshaut ergaben 2 - 2,5 g getrocknete Haare und 0,25 - 0,30 g getrocknete Epidermis. 100 cm² Kalbshaut wiegen in getrockneter Form ca. 13 g, damit folgt für den Haaranteil dann ca. 18 % und für den Epidermisanteil 2 %, bezogen auf getrocknete Haut. Bei Rindshäuten ermittelten wir einen Haaranteil, der zum Teil nur 4 % getrocknete Haare bezogen auf getrocknete Haut betrug.

Das Verhältnis von nasser zu trockener Haut ist nicht genau festzulegen. Die frisch vom Tierkörper abgezogene nasse Haut hat im allgemeinen 250 % des Trockenhautgewichts (gleich 100 %), also das 2 1/2 fache. Das obengenannte Kalbshautstück von 100 cm² wiegt demnach in nassem Zustand etwa 32 g.

Danach entfallen auf 32 g nasse Haut etwa 2,2 g oder auf 100 g nasse Haut etwa 7 g Haarsubstanz. Auf 100 g nasse Haut wendet der Gerber aber, wie oben schon gesagt, etwa 200 - 300 ml Flotte und in dieser gelöst 1-4 g Natriumsulfid (66 %ig) an. Das Verhältnis zwischen Natriumsulfid und Haarsubstanz, wie es in der Praxis angewendet wird, beträgt demnach 14 bis zu 56 %, bezogen auf trockenes Haar. (1 - 4 g Natriumsulfid auf 7 g Trockenhaar).

Von besonderer Bedeutung ist aber, wie wir später zeigen werden, die Konzentration des Enthaarungsmittels Natriumsulfid in der Flotte. Diese ist in der Praxis, wenn wir 200 % Flotte, bezogen auf nasse Haut, in Rechnung stellen, relativ gering. Das Flottenvolumen, das sich auf 100 g nasse Haut bezieht, beträgt 200 ml, wozu man noch 50 ml Wasser als in der Haut gebundenes Wasser hinzurechnen sollte. Somit ergibt sich eine Na₂S-Konzentration (66 %ig) von 1/250 bis zu 4/250, d.h. 0.4 - 1.6 %ige Lösungen oder wenn man 100 %iges Na₂S zugrundelegt, 0.26 %ige bis zu 1.05 %ige Lösungen.

Viel höher sind die Konzentrationen beim Schwödeprozeß. Hierbei wendet man im allgemeinen ein Flüssigkeitsvolumen von 20 %, bezogen auf nasse Haut, an. (Bei der Faßschwöde sind auch Flüssigkeitskonzentrationen von 50 bis zu 80 % vorgeschlagen worden). Für den Schwödeprozeß ergibt sich also ein Flüssigkeitsvolumen (bezogen auf 100 g nasse Haut) von 20 ml Flotte + 50 ml gebundenes Wasser = 70 ml Flüssigkeit, so daß die Konzentration (für 1 - 4 g 66 %iges Na₂S auf 7 g Haare) 1.4 bzw. 5.7 % beträgt, oder entsprechend auf 100 %iges Na₂S gerechnet, 0.95 %ige Lösung bzw. 3.8 %ige Lösung.

In Wirklichkeit dürften die Konzentrationen etwas höher liegen, denn das Hydratwasser der Haut darf ja sicherlich nicht voll als Lösungswasser für das Natriumsulfid eingesetzt werden.

1. Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Reaktion (Kinetik)

Zuerst wurde die Zeitabhängigkeit der Reaktion bestimmt. Dazu wurden Haare mit verschiedenen Enthaarungsmitteln verschieden lange Zeiten behandelt und die Menge des gelösten bzw. des ungelösten Anteils bestimmt. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die anderen Einflußgrößen, wie Temperatur, Konzentration an Enthaarungsmitteln usw. konstant gehalten. Das wurde dadurch erreicht, daß alle Versuche mit schwarzen Kalbshaaren durchgeführt wurden und daß die Keratinlösungsmittel Na_2S , Na_2O_2 und Peressigsäure (PES) stets in Mengen von 25 %, bezogen auf das Trockengewicht der Haare, angewendet wurden. Dieses Verhältnis entspricht durchaus praxisüblichen Bedingungen, wie wir oben ausgeführt haben; ferner entspricht diesen Bedingungen auch das Verhältnis von Reaktionsflüssigkeit zu Haaren. Es wurden nämlich auf 1 g Haare jeweils 10 ml Flotte eingesetzt.

Die Versuchsproben wurden in Erlenmeyerkolben bei Zimmertemperatur über verschieden lange Zeiten geschüttelt. Nach der betreffenden Zeit wurde der ungelöste Anteil abzentrifugiert und der noch nicht ganz klare Überstand durch gewogene Fritten filtriert und die Niederschläge in der Zentrifuge bzw. auf den Fritten neutral gewaschen; Waschwasser und Filtrat vereinigt und dieses dialysiert, gefriergetrocknet und gewogen. Außerdem wurden die Rückstände gewogen.

Die Angaben über die löslichen Anteile sind in den Diagrammen niedergelegt. Sie wurden durch Differenzenbildung aus den Rückstandsgewichten und den Gesamtgewichten gewonnen und in Prozentgehalte umgerechnet. Die aus dem Dialyserückstand, der den gelösten Anteilen entspricht, gewonnenen Werte waren allgemein 2, jedoch höchstens 5 % geringer als die theoretischen. Abb. 6 läßt für Na_2S , Na_2O_2 und PES die kinetischen Kurven erkennen. Von Bedeutung sind die Zeitabschnitte zwischen 5 und 20 Stunden, weil einerseits eine Reaktionszeit von 3 Stunden, wie die Versuche zeigen, in keinem Falle ausreicht, um eine vollständige Auflösung der Haare herbeizuführen und weil andererseits eine Ausdehnung der Reaktion über 20 Stunden hinaus vor allem vom praktischen Standpunktaus indiskutabel ist.

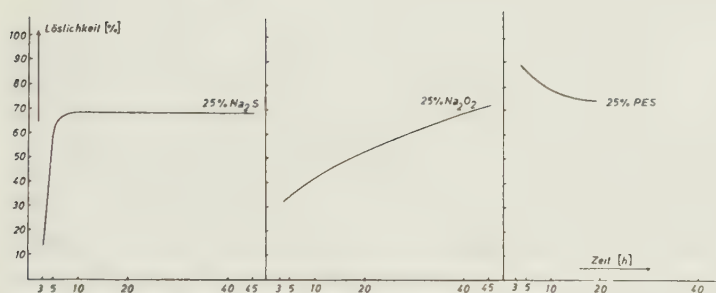


Abb. 6: Kinetik der Reaktion

Man erkennt, daß die Auflösung von Haaren mit Na_2S schon nach 5 Stunden nahezu einen Endpunkt erreicht hat. Selbst bei einer Ausdehnung der Versuchsdauer bis zu 45 Stunden erfolgt kaum noch eine Zunahme. Ganz anders sind die Verhältnisse bei den Auflösungsversuchen mit Na_2O_2 . Hier beobachtet man eine nahezu lineare Zunahme der Auflösung mit der Zeit und auch nach einer Versuchsdauer von 45 Stunden ist noch kein Abknicken der Kurve festzustellen. Überraschend ist der Verlauf der Auflösungskurve mit Peressigsäure. Man beobachtet schon nach einer Reaktionsdauer von mehr als drei Stunden eine Abnahme der Auflösung. Dieser Befund war der erste Hinweis, daß bei der Einwirkung von PES auf Keratinproteine nicht nur eine Eiweißspaltung erfolgt, durch die das Protein in Lösung gehen kann, sondern daß der Eiweißspaltung eine Folgereaktion angeschlossen sein muß, bei der die Eiweißbruchstücke wieder vernetzt werden. Weiter kann man feststellen, daß die Auflösungskurve ein Maximum, wahrscheinlich bei etwa 3 Stunden Versuchsdauer, haben muß.

Diese Beobachtung wurde zum Anlaß für eine eingehende Untersu-

chung des Verhaltens des Kollagens in Gegenwart von PES, die am hiesigen Institut von C. Jancu durchgeführt wird. Es ist bekannt, daß speziell bei der Einwirkung von chloriger Säure bzw. Chlordioxid, welches beim Ansäuern von Natriumchloritlösungen entsteht, eine Verhärtung des Leders, speziell in der Narbenschicht auftritt. Diese Beobachtung, zusammen mit der Verminderung der Löslichkeit der keratinösen Substanzen, wie sie die Abb. 6 zeigt, war bisher nicht zu deuten. Das Vernetzen von Kollagen konnte von C. Jancu folgendermaßen nachgewiesen werden. Sowohl in der Disk-Elektrophorese als auch bei der CM-Chromatographie nach Piez [42] fand er, daß säurelösliches Kollagen nach der Behandlung mit PES einen höheren Anteil an β -, also den vernetzten Komponenten, aufwies. Zusätzlich trat aber - und dies war besonders gut mit Hilfe der Disk-Elektrophorese nachzuweisen - ein beträchtlicher Anteil von niedermolekularen Bestandteilen auf. Die gleiche Beobachtung machte C. Jancu, wenn er isolierte α_1 - bzw. α_2 -Ketten des Kollagens nach der Behandlung mit PES untersuchte. Auch hier traten wiederum einerseits Abbauprodukte der α_1 -Ketten, andererseits aber typische β -Komponenten, also Vernetzungsprodukte von je 2 Kollagenketten auf. Interessanterweise fand die Vernetzung nicht statt, wenn man im nativen Zustand mit α -Chymotrypsin die Telo peptide abspaltete. In diesem Fall beobachtet man nur die niedermolekularen Spaltprodukte. Das bedeutet, daß offenbar die Vernetzung über die Telo peptide erfolgte. Da bisher noch nicht eindeutig sichergestellt ist, über welche der dort befindlichen Gruppen eine Vernetzung möglich ist, können wir auch noch nichts über die Möglichkeiten einer Vernetzung von Keratinketten äußern.

2. Untersuchung der Zeitabhängigkeit bei Kombinationen von je zwei verschiedenen Enthaarungsmitteln

Die Kombinationen wurden so vorgenommen, daß nacheinander z.B. Na_2S und Na_2O_2 (bzw. beide in umgekehrter Reihenfolge) auf die Haare zur Einwirkung gebracht wurden. Wichtig war dabei, daß nach Einwirkung des ersten Enthaarungsmittels die dann verbleibenden Rückstände in gleicher Weise zentrifugiert und neutral gewaschen wurden, wie es im vorhergehenden Abschnitt geschildert wurde. Erst dann wurde das zweite Enthaarungsmittel auf die ver-

bleibenden Rückstände zur Einwirkung gebracht. Die auf der Abszisse der Abb. 7 angegebenen Zeiten sind die Einwirkungszeiten für jedes der beiden Enthaarungsmittel für sich, so daß in Wirklichkeit bei diesen Versuchen stets eine doppelte Einwirkungszeit, wenn man beide zusammenrechnet, vorliegt.

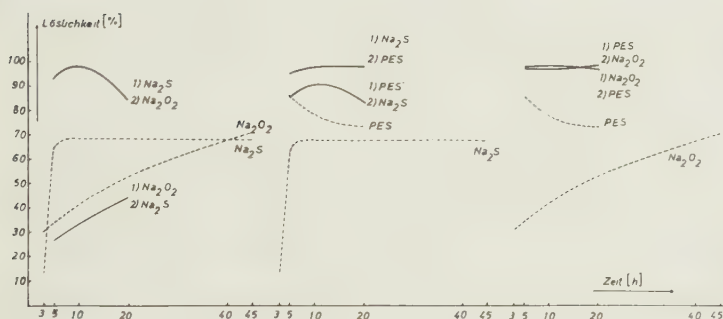


Abb. 7: Kinetische Kurven bei kombinierter Anwendung von Enthaarungsmitteln

In Abb. 7 erkennt man, daß mit Ausnahme der Enthaarungsmittelkombination 1.) Na_2O_2 + 2.) Na_2S die Werte für die Auflösung bei allen anderen Kombinationen in dem Bereich zwischen 85 und 100 % Löslichkeit liegen. Die beste Wirksamkeit zeigen die Kombinationen 1.) Na_2O_2 + 2.) PES und 1.) PES + 2.) Na_2O_2 , bei denen die Addition der Wirkung der beiden oxidativen Mittel zuerst im alkalischen und dann im sauren Medium bzw. umgekehrt zu einer sehr guten Auflösung führt.

Betrachtet man die Kombination 1.) Na_2S + 2.) PES und 1.) PES + 2.) Na_2S , so fällt auf, daß die zweite Kombination, bei der die Haare zunächst oxydierend und dann reduzierend gelöst werden, eine viel geringere Auflösung der Haare ergibt als bei umgekehrter Anwendung der Enthaarungsmittel. Die gleichen Ergebnisse erhält man bei der Anwendung der Kombinationen zwischen Na_2S

und Na_2O_2 . Auch hier werden die Haare weniger gut gelöst, wenn man zuerst das oxydierende und anschließend das reduzierende Enthaarungsmittel anwendet. Diese Befunde kann man folgendermaßen erklären:

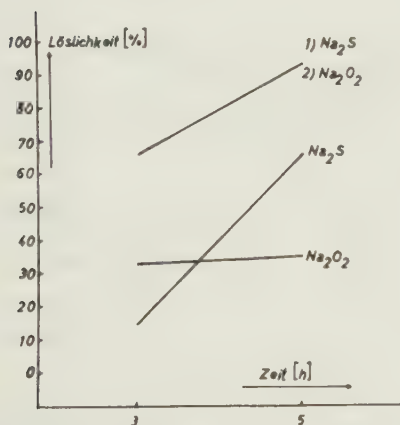
Das keratinöse Haar ist gegenüber keratolytisch wirkenden Agenzien relativ stabil. Es stellt, wie wir schon eingangs sagten, ein heterogenes System in Bezug auf seine Zusammensetzung dar und besteht aus einem keratinösen Anteil (der teils leicht, teils schwer reduzier- und oxydierbare Anteile besitzt) und einem hohen Melaninanteil. Das Melanin ist möglicherweise, wie das auch andere Autoren [43] vermuteten, sehr eng mit Proteinkomponenten verknüpft, die dadurch sehr viel schwerer angegriffen werden, als die leicht oxydier- oder reduzierbaren Anteile der Haarmatrix.

Wendet man die Enthaarungsmittel in der Reihenfolge 1.) Na_2S + 2.) PES an, so wird durch das reduzierend wirkende Na_2S ein großer Anteil des Keratins gelöst. Die oxydierend wirkende Peressigsäure kann jetzt den ungelösten, melaninhaltigen Anteil viel besser angreifen als im umgekehrten Fall, wenn zuerst PES und danach Na_2S zum Auflösen der Haare angewandt wird, da hierbei die Peressigsäure ihre Oxydationswirkung zum Lösen des Keratins aufwenden muß. Das anschließend eingesetzte Na_2S vermag mit den melaninhaltigen Rückständen kaum eine Reaktion einzugehen, weil Melanine durch reduzierende Mittel überhaupt nicht, sondern nur durch oxydierende Mittel angegriffen werden. Der hier angeführte Mechanismus muß offenbar auch für die Kombinationen 1.) Na_2S + 2.) Na_2O_2 und 1.) Na_2O_2 + 2.) Na_2S gelten. Dieser Mechanismus erklärt auch, daß man durch die kombinierte Anwendung der Enthaarungsmittel keine 100 %ige Auflösung erreicht (die man erwarten dürfte, wenn sich die Wirkungen der einzelnen Enthaarungsmittel addierten). (In Abb. 7 haben wir gestrichelt die Kurven der Abb. 6 eingezeichnet, um deutlich zu machen, wie groß der Effekt schon bei Einsatz einer der Komponenten allein ist.) In der untersten Kurve der Abb. 7 ganz links erkennt man die Ungenauigkeit der Bestimmung daran, daß diese Kurve unterhalb der von Na_2O_2 allein liegt.

In einem Ergänzungsversuch konnten wir aber doch zeigen, daß sich die Wirkungen von z.B. Na_2S und Na_2O_2 in Kombination doch addieren, allerdings nur dann, wenn man eine kurze Einwirkungs-

zeit von 3 - 5 Stunden wählt. Diese Beobachtung bestätigt das vorhin Gesagte, daß nämlich nur dann Additivität zu erwarten ist, wenn von der leichter auflösbaren Komponente des Keratins genügend vorhanden ist, d.h., daß man das Melanin außer acht lassen kann. So ist die Additivität, wie man in Abb. 8 erkennt, bei einer Einwirkungszeit von 3 Stunden besser als bei 5 Stunden. Die in Abb. 8 dargestellte Kurve stellt somit den allerersten Teil der entsprechenden Kurve der Abb. 6 dar.

Abb. 8: Additivität der Wirkung von Na_2S und Na_2O_2
in Abhängigkeit von der Zeit



3. Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Auflösung

Der zweite wichtige Parameter ist die Konzentrationsabhängigkeit. Bei diesen Versuchen mußten naturgemäß die Enthaarungszeiten konstant gehalten werden. So betrug die Reaktionszeit 5 Stunden unter Schütteln bei Zimmertemperatur im Erlenmeyerkolben. Wir erweiterten aber den Versuch insofern, als wir neben schwarzen Haaren auch weiße Haare untersuchten. Im übrigen wurde unter sonst gleichen Bedingungen, wie in Abschnitt 1 beschrieben, gearbeitet. Die Versuche erhielten auch dadurch noch eine Erweiterung, daß mit dem von K. Rosenbusch [6] vorgeschlagenen Enthaarungsmittel Chlordioxid, das stellvertretend für alle beim Ansäuern von Natriumchloritlösungen entstehenden oxydierenden Pro-

dukte, wie z. F. Chlordioxid und chlorige Säure, genannt wird, gearbeitet wurde. Die Versuche sind ferner noch durch das von Somerville [5] vorgeschlagene Enthaarungsmittel Dimethylamin-Natronlauge, Natriumsulfat erweitert worden. Die Ergebnisse sind in den Abb. 9 - 14 dargelegt worden. In jeder Abbildung sind die Ergebnisse von schwarzen und weißen Haaren nebeneinander aufgeführt worden.

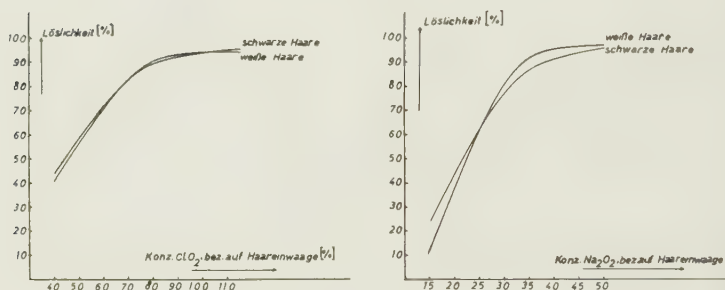
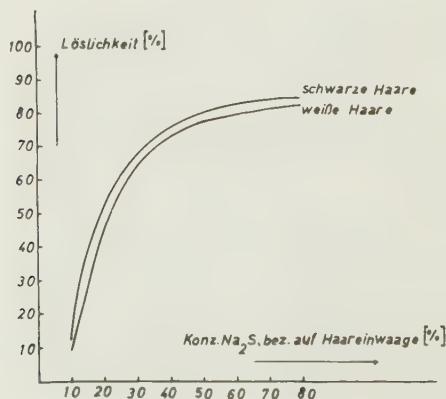


Abb. 9,10,11 Abhängigkeit der Löslichkeit von der Konzentration



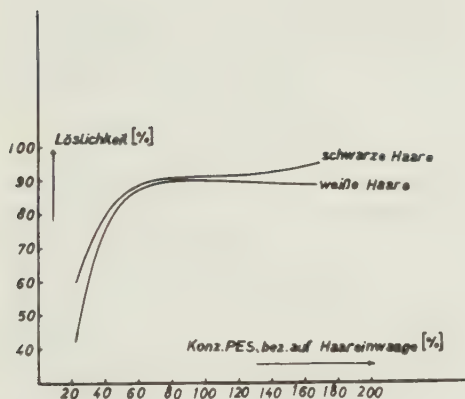


Abb. 12: Abhängigkeit der Löslichkeit von der Konzentration

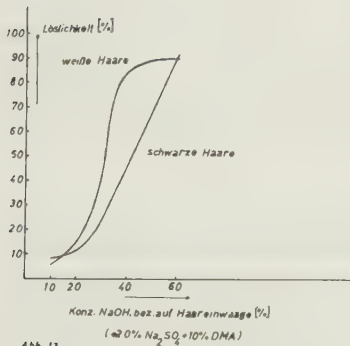


Abb. 13

($\approx 0\% \text{ Na}_2\text{SO}_4 = 10\% \text{ DMA}$)

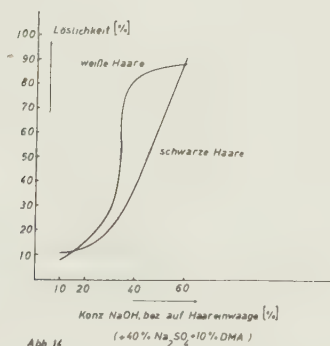


Abb. 14

($\approx 40\% \text{ Na}_2\text{SO}_4 = 10\% \text{ DMA}$)

Abhängigkeit der Löslichkeit von der Konzentration

Es ist an sich nicht überraschend, daß die Löslichkeit mit steigender Konzentration zunimmt. Die Zunahme erfolgt jedoch nicht stetig, sondern es zeigen sämtliche Kurven zunächst eine starke Steigung, welche an einem bestimmten Punkt in einen flacheren asymptotischen Verlauf übergeht. Diese Beobachtung steht ebenfalls im Einklang mit dem vorher genannten heterogenen Aufbau der Haare. Offenbar wird zunächst ein leichter löslicher Anteil erfaßt und später erst ein schwer angreifbarer Anteil.

Die Kurven für die einzelnen Enthaarungsmittel unterscheiden sich naturgemäß in der Kurvenform, d.h. in der Lage dieses Übergangsbereiches von dem ersten schnellen Anstieg bis zum asymptotischen Verlauf. Man kann allgemein sagen, daß der Knick bei Natriumperoxid bei etwa 30 - 40 %, bei Natriumsulfid etwa ebenfalls um 40 % und bei PES zwischen 40 und 60 % liegt. Bei Chlordioxid beobachtet man den Knick etwa bei 80 % (die Konzentrationsangaben von Chlordioxid beziehen sich auf eine 30 %ige Chloritlauge) und bei Natriumhydroxid - Dimethylamin bei etwa 40 %. Von den sauren keratolytisch wirkenden Chemikalien braucht man also offenbar höhere Konzentrationen zum Inlösungsbringen des Keratins.

Da die Versuche alle in dem gleichen Haar-Flüssigkeitsverhältnis von 1:10 durchgeführt wurden, können auch die schon eingangs auf S. 18, 19 genannten Überlegungen hinsichtlich der gerbereichemischen Praxis in die Diskussion einbezogen werden. Man befindet sich mit einer Konzentrationsangabe von 40 % (die ja immer die Konzentration an Enthaarungsmittel, bezogen auf eingesetztes trockenes Haar darstellt) in dem Bereich, der unter praktischen Bedingungen als Höchstkonzentration in Frage kommt, wie z.B. mit 4 % Schwefelnatrium.

Eine weitere Frage ist die absolute Höhe der Kurve im asymptotischen Bereich. Hier kann man die verschiedenen Enthaarungsmittel miteinander vergleichen, und man kann feststellen, daß man mit Natriumperoxid die höchsten Auflösungswerte erreicht. Es folgen dann die Versuche mit Chlordioxid bzw. PES, gefolgt von dem Versuch mit Natronlauge-Dimethylamin und schließlich die mit Natriumsulfid. Eine ähnliche Reihenfolge beobachteten wir ja schon in den vorhergehenden Versuchen zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit (vgl. Abb. 6).

Eine weitere Frage ist der Vergleich der Auflösbarkeit von weißen und schwarzen Haaren (siehe Abb. 9 - 14). Es war überraschend zu beobachten, daß in vielen Fällen schwarze Haare besser aufgelöst werden als weiße. Dies gilt in Maßen (Abb. 11) für PES und für die Versuche mit Chlordioxid. Deutlicher sichtbar ist der Unterschied bei Na-Sulfid (Abb. 12). In diesem Falle werden die schwarzen Haare weitaus besser gelöst als weiße Haare. Umgekehrt ist es bei der Auflösung mit Na-Peroxid: Hier werden weiße Haare wenigstens im höheren Konzentrationsbereich deutlich besser gelöst (Abb. 9). Sehr groß wird der Unterschied bei den Versuchen mit Natronlauge und Dimethylamin (Abb. 13,14). Bei hohen Konzentrationen von mehr als 40 % überschneiden sich die Kurven gerade an der Stelle, wo die Messungen unterbrochen wurden, weil derartig hohe Konzentrationen praktisch sinnlos sind. Eine Erklärung für dieses Verhalten kann nicht gegeben werden. Es kann nicht argumentiert werden mit einer Unterscheidung zwischen oxydativen und reduktiven Enthaarungsmitteln bzw. sauren und alkalischen Mitteln.

Schließlich muß noch festgestellt werden, daß zwischen den beiden Kurven, die mit verschiedenen Mengen Natriumsulfat unternommen wurden, keine Unterschiede gefunden werden konnten. Eine Erhöhung der Natriumsulfatkonzentration von 20 auf 40 % gibt keine verminderten Ausbeuten, wie das ursprünglich erwartet wurde, weil ja Natriumsulfat, ähnlich wie Kochsalz, alkalisch-hydrolytische Prozesse zu hemmen vermag (siehe Abb. 9). Offenbar ist die Konzentration mit 40 % noch nicht so hoch, daß sie von gravierendem Einfluß sein kann. Bemerkenswert bei den Versuchen mit Natronlauge und Dimethylamin ist lediglich, daß die Kurven sich, von 10 auf 20 % Natronlauge ansteigend, nur wenig steil darbieten. Erst von 20 - 40 % Natronlauge findet eine nennenswerte Keratolyse statt. Das bedeutet, daß offenbar eine gewisse Mindestkonzentration an Natronlauge erforderlich ist, um Dimethylamin eine gute keratolytische Wirksamkeit zu verleihen.

4. Weitere Einzelversuche

Im folgenden ist noch über einige weitere Einzelversuche zu berichten. Aus der Keratinchemie ist bekannt, daß man nach reduktiver Keratolyse mit Natriumthioglykolat oder mit Thiophenolat an-

schließlich eine Blockierung der freigesetzten SH-Gruppen mit Jodessigsäure, Jodacetamid oder anderen Alkylierungsreagenzien vornimmt. Der Sinn dieser Behandlung liegt in einer Verhinderung einer Rekombination der SH-Gruppen zu S-S-Brücken. Es lag daher nahe zu prüfen, ob sich gegebenenfalls die Löslichkeit dadurch erhöht, daß man im Anschluß an die Keratolyse mit Natriumsulfid z.B. mit Jodessigsäure alkyliert. Sollten unter den Bedingungen der Keratolyse oder der nachherigen Aufarbeitung der Keratolyseprodukte durch Rekombination gewisse Molekülanteile wieder unlöslich werden, so sollte das durch eine derartige Alkylierung vermieden werden können. Für die Versuche wurden jeweils 1 g schwarze bzw. weiße Haare mit 0,25 g Na_2S (66 %ig) und wie üblich mit 10 ml Wasser versetzt und die Probe 1/2 Stunde geschüttelt. Dann wurde der Lösung direkt 10 % Jodessigsäure zugesetzt und weitere 4 1/2 Stunden geschüttelt. Die Aufarbeitung erfolgte nach der vorn genannten Methode.

Tab. 2:

Haarart	mit CH_2JCOOH	ohne CH_2JCOOH
schwarze	48 %	65 %
weiße	46 %	65 %

Tab. 2 zeigt, daß überraschenderweise bei Gegenwart von Jodessigsäure eine geringe Keratolyse erkennbar war. Diese Tatsache mag daran liegen, daß die Lösung durch den Zusatz von Jodessigsäure etwas Alkalität verloren hat. Es kann aber auch an der spezifischen Wirkung der Jodessigsäure liegen, obwohl dieses nicht sehr wahrscheinlich ist.

Zur Deutung kann ferner folgende Überlegung dienen. Da das Verhalten von Jodacetat oder Jodessigsäure nicht bekannt ist, kann man vergleichend das Verhalten von Chloressigsäure heranziehen. Es ist bekannt, daß Monochloressigsäure ein sehr gutes Hydrotopikum ist. Desgleichen ist Dichloressigsäure ebenfalls ein gutes Proteinlösungsmittel, während Trichloressigsäure ein ausgesprochenes Proteinfällungsmittel ist. Man sollte also erwarten, daß Jodessigsäure zumindest die Auflösung wenn auch nicht fördert, so doch nicht stört. Da dies nicht der Fall ist, kann man

nur annehmen, daß die Jodessigsäure, die in freier Form zugesetzt wurde, einen bestimmten Anteil des Na_2S unwirksam macht, indem sie die Alkalität vermindert. Es ist hierbei zu überlegen, daß schätzungsweise etwa 20 % der OH^- -Ionen durch den Zusatz von Jodessigsäure verbraucht werden.

Ein ähnlicher Versuch wurde mit weißen Haaren bei der Einwirkung von Natriumborhydrid unternommen. In analoger Weise wurde 1 % Natriumborhydrid 1/2 Stunde mit den weißen Haaren geschüttelt, dann 10 % Jodessigsäure zugesetzt und der pH-Wert auf 10 eingestellt und weitere 4 1/2 Stunden geschüttelt. Dann wurde wie üblich aufgearbeitet.

Tab. 3 zeigt, daß der sonst unter gleichen Bedingungen, aber ohne Jodessigsäure vorgenommene Versuch überraschenderweise auch in diesem Falle eine erhöhte Löslichkeit ergeben hat. Es kann bei dem Versuch mit Na_2S die verminderte Alkalität nur einen geringen Einfluß gehabt haben.

Tab. 3:

Gelöster Anteil	
mit CH_2JCOOH	ohne CH_2JCOOH
4.6 %	5,5 %

Ein weiterer Versuch diente der Erforschung der Kombination der beiden reduzierenden Mittel Na_2S und Natriumborhydrid. Hierzu wurden wiederum schwarze Haare einerseits mit Natriumborhydrid allein, andererseits mit Natriumborhydrid und Na_2S in einem gemeinsamen Bad und bei einem dritten Versuch erst mit Na_2S und danach mit Na-Borhydrid behandelt. In diesem Falle erfolgte die Behandlung über 3 Stunden. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 niedergelegt.

Tab. 4

Versuch Nummer	Art der Substanz	Enthaarungschemikalien in [% bezogen aufs Haargewicht]		gelöster Anteil in %
		Na_2S	NaBH_4	
1	1 g schwarze Haare	-	25	6,7
2	1 g schwarze Haare	25	25	35,5
3	1 g schwarze Haare	25	25	46,6

Zur Diskussion der Ergebnisse dieser Tab. 4 ist es wichtig, aus einem vorhergehenden Diagramm (Abb. 6) zu entnehmen, daß nach 3-stündiger Behandlung mit 25 %igem Na_2S 14 % an schwarzen Haaren gelöst werden. Betrachtet man nun die Tabelle, so erkennt man, daß die gemeinsame Behandlung von Na_2S und Natriumborhydrid mit 35,5 % einen bedeutend höheren Anteil des Keratins in Lösung bringt, als dies eine Addition aus der alleinigen Behandlung, nämlich $14 \% + 6,7 = 20,7 \%$ erwarten läßt. Eine hintereinander erfolgende Behandlung (s. Tab. 4, Zeile 3) gibt einen abermaligen Zuwachs an Löslichkeit. Daß sich die Wirkung der beiden reduzierenden Agenzien addiert und sich sogar progressiv steigert, ist angesichts des hohen Reduktionspotentials von Natriumborhydrid nicht verwunderlich. Überraschend ist jedoch, daß dies auch der Fall ist, wenn das Natriumborhydrid in einem neuen Fad zugegeben wird. Es kann aber gleichfalls, wie auch schon oben, damit interpretiert werden, daß man im Keratin offenbar ein sehr heterogenes Gemisch an Protein vorliegen hat. Die Spezifität der Keratolyse von Natriumborhydrid ist demnach also offenbar eine andere als die von Na-Sulfid. Wirkt also nur ein Auflösungsmittel auf die Faser, so kann nur ein bestimmter Anteil in Lösung gehen. Ein weiterer Anteil kann, obwohl ein großer Teil seiner Bindungen gespalten ist, deswegen nicht in Lösung gehen, weil einige wenige Bindungen durch dieses Keratolysemittel nicht erfaßt werden. Diese Bindungen werden nun durch das andere leicht aufgelöst, so daß sich das Keratin in einem hohen Maße löst, und zwar in einem viel höheren, als dies jedes Keratolysemittel allein zuwege bringen

kann. Über die Art der Bindungen kann man bisher noch nichts sagen. Die Versuche legen jedenfalls nahe, daß es sich bei der keratolytischen Wirkung nicht allein um die reduktive Spaltung der S-S-Brücken handelt, sondern, daß eine Vielzahl von Nebenwirkungen dabei noch eine Rolle spielen mag.

II. Methoden zur Gewinnung von Haarwurzel- und Haarwurzel- scheidenproteinen

Nach den oben ausgebreiteten Versuchen über das Inlösungbringen von Haaren, stellte sich nun die Frage, die Versuche auszudehnen, auf diejenigen Anteile an Keratinsubstanz, die den Halt der Haare in der Haut vermitteln. Es soll im folgenden eine Methode zur Gewinnung dieser Haarbestandteile mitgeteilt werden, die von uns entwickelt wurde, und die wir schon, weil sie allgemeines Interesse für die Keratinforschung besitzt, vor einem Jahr beschrieben haben [44]. Die Gewinnung der Haarwurzeln erfolgte bisher nach der von J. Ellis [45] angegebenen "Wax-sheet-methode". Sie ist ganz allgemein gebräuchlich. Hierbei werden Haare von der ausgebreiteten Haut auf eine Höhe von 2 - 3 mm abgeschoren. Alsdann gießt man ein 60° C heißes Wachs-Kolophonium-Gemisch in 5 mm Dicke auf die Haut. Nach dem Erhitzen wird die Haut von der Wachsschicht abgezogen. Die auf der Wachsschicht zurückbleibenden Haarwurzeln werden dann abrasiert.

Wir haben diese Methode ebenfalls angewendet. Es gelang uns jedoch nicht, die Haare vollkommen aus der Haut zu entfernen. Zur Gewinnung der Haarwurzelscheiden eignet sich diese Methode - und das war der größte Nachteil - überhaupt nicht. Wir versuchten nämlich, von den Haarwurzeln durch Bürsten die Haarwurzelscheidenproteine, die sich als glasige Substanz zu erkennen gibt und die die Haarwurzel umgibt (vergl. spätere Abbildungen), zu entfernen. Beim Abbürsten ließ es sich nämlich nicht vermeiden, daß die Wachsschicht angegriffen wurde, wodurch erhebliche Mengen Wachs in die so gewonnenen Haarwurzelfraktionen mit hineingelangen.

Wir verwendeten ferner die Warmwasserenthaarungsmethode, die R. Hauk [46] angegeben hatte. Nach dieser sehr mühsamen und aufwendigen Methode hatte Wagner [47] gearbeitet. Sie besteht darin, daß man die Haut in warmes Wasser einlegt, wodurch sich die Haare lockern. Alsdann werden die Haare büschelweise herausgezogen. Nun muß man mit einer feinen Schere die Haarwurzeln abschneiden. Die Haarwurzelscheiden kann man gewinnen,

wenn man diese Büschel bürstet. Dabei ließ es sich jedoch nicht vermeiden, daß sich immer wieder einige Haare aus dem Büschel lösten und dann mit in die Scheidenfraktion hineingelangten und aus dieser herausgelesen werden mußten. Außerdem wird bei der Warmwasserenthaarung ein Großteil der Epidermis miterfaßt, die dann an den Haarwurzeln hängt und somit die Wurzelscheidenfraktion verunreinigt. Gleichfalls erfolgte stets eine gewisse Verschmutzung durch den von der Haut nie ganz zu beseitigenden Schmutz der tierischen Haut.

Wegen der Schwierigkeiten bei diesen beiden genannten Methoden haben wir die "Wax-sheet-Methode" verbessert. Anstelle des Wachs-Kolophonium-Gemisches vermischten wir monomeres Methylmethacrylat mit einem Starter, brachten es auf die Haut, von der wir die Haare zunächst bis auf 2 mm etwa entfernt hatten, auf. Nach kurzer Zeit erstarrte die Masse zu polymerem Kunststoff, einer durchsichtigen Platte aus Plexiglas. Die Haare waren nunmehr außerordentlich fest eingebettet und konnten durch kräftiges Abreißen von der Haut getrennt werden. Die Enthaarung war weitaus vollständiger als im Falle der "Wax-sheet-Methode". Die Scheidenproteine konnten spielend leicht mit einer feinen Nylonbürste abgebürstet werden und in Schalen gesammelt werden. Ein anschließendes Rasieren ergab eine Fraktion, die wir "Haarwurzeln" nannten. Abb. 15 zeigt in einer schematischen Darstellung das Vorgehen. Abb. 16 zeigt das Abziehen der Haut von der Plexiglasplatte.

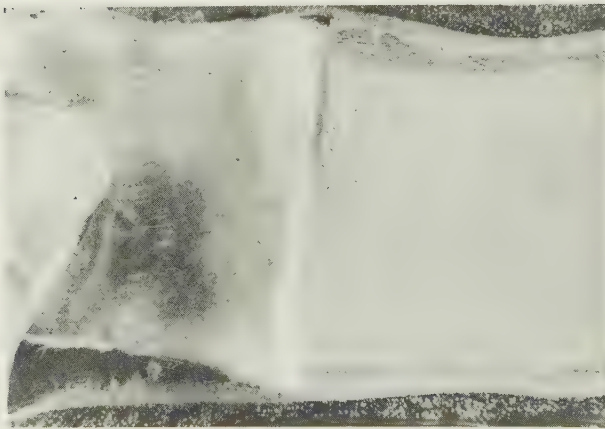
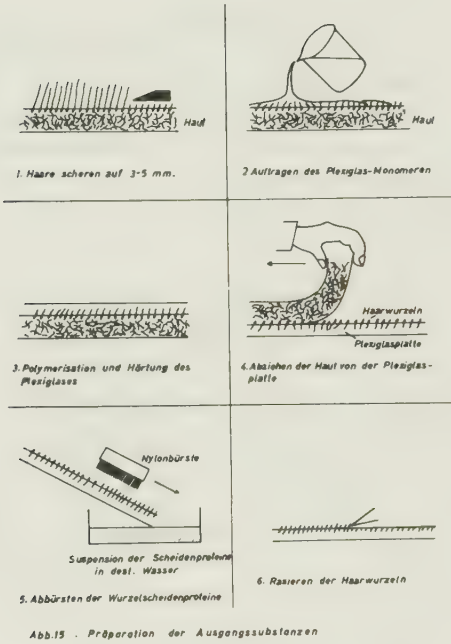
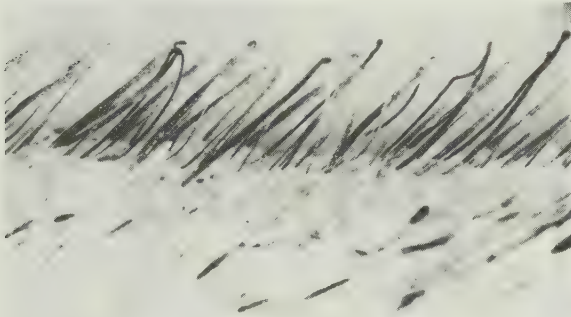


Abb. 16: Das Abziehen der Haut von der Plexiglasplatte

Abb. 17 zeigt einen Querschnitt durch die Plexiglasplatte mit den daraus hervorragenden Haaren. Man erkennt auf diesem Bild sehr deutlich die tiefer liegenden, d.h. weiter herausragenden, langen schwarzen Papillenhaare und die feineren Kolbenhaare, die in dem Bereich der Haarwurzelzone wenig pigmentiert sind.



Vergr. 20x

Bei entsprechender Vergrößerung erkennt man um jedes Einzelhaar herum die Haarwurzelscheidenproteine (Abb. 18 - 19)

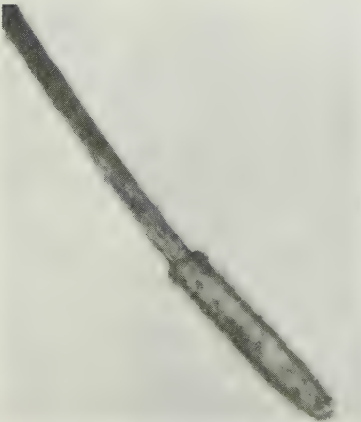


Abb. 18 Kolbenhaar
Vergr. 75x

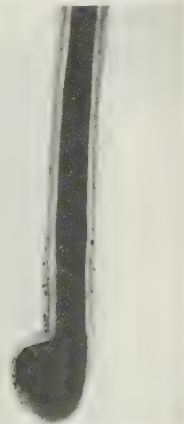
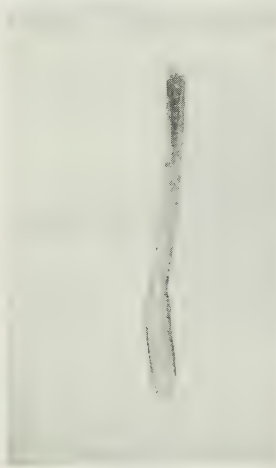
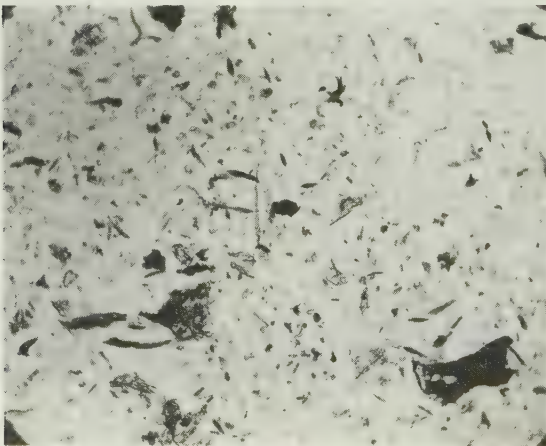


Abb. 19 Papillenhaar
Vergr. 70x

Abb. 20 - 21 zeigen abgebürstete Kolben- und Papillenhaare, die keine Wurzelscheiden mehr haben.



Die in der Schale in Wasser aufgefangenen Haarwurzelscheiden werden mit Wasser vorsichtig durch ein Sieb der Maschenweite von 0,25 mm gesiebt und anschließend gefriergetrocknet. In Abb. 22 sieht man diese abgebürsteten Haarwurzelsproteine.



Vergr. 85x

Abb. 22

In Abb. 23 erkennt man ein Stück innerer Wurzelscheide.



Vergr. 370x

Mit Hilfe der Plexiglas- methode ist es uns gelungen, von 1 m² Kalbshaut ca. 1,5 g Haarwurzelscheiden und 5 - 10 g Haarwurzeln zu gewinnen.

Interessant ist, daß bei der Plexiglas- methode die Epidermis auf der Haut zurückbleibt. Sie kann von der nassen Haut als dünne, leicht zerreisende Membran mit Hilfe einer feinen Pinzette vorsichtig abgehoben werden. Hiervon gibt die Abb. 24 einen Eindruck.



Abb. 24: Abziehen der Epidermis von der Haut

III. Untersuchung der Auflösbarkeit von Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden

Zur Untersuchung des Problems dienten die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Präparate der Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden. Sie wurden in Portionen von etwa 200 - 300 mg getrockneter Substanz eingewogen und wurden dann 5 Stunden bei Zimmertemperatur in einer Konzentration an Enthaarungsmitteln von 25 % (1 ml Flotte/100 mg Proteine) bezogen auf das Trockengewicht von Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden, behandelt. Die Versuchsbedingungen wurden analog denen mit den Haaren gewählt, damit man die Ergebnisse vergleichen kann. Die Versuche wurden ausgeführt mit Präparaten, die von weißen und schwarzen Haaren stammten. Auch den Wurzeln und den weniger pigmentierten Scheiden sieht man die Herkunft noch an. Die Aufarbeitung der Ansätze erfolgte analog wie bei den Versuchen mit ganzen Haaren. Nach der Filtration durch eine Fritte G 2 wurde solange gewaschen, bis kein Enthaarungsmittel mehr nachweisbar war. Waschwasser und abgesaugte Enthaarungslösung wurden dialysiert und das Dialysat gefriergetrocknet und gewogen. Der Rückstand wurde ebenfalls getrocknet und gewogen. Die Differenz, die sich aus dem direkt bestimmten Auflösbaren und dem über den Rückstand durch Abzug vom Eingesetzten ergab, war nicht sehr groß; sie betrug maximal 5 %. Das bedeutet, daß die Versuche zuverlässige Ergebnisse ergaben. Die Zuverlässigkeit wurde auch dadurch erhöht, daß die Versuche mehrfach wiederholt wurden. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 dargelegt.

Tab. 5

Wurzelscheide			Wurzel		
Enth. Mittel	Löslichkeit [%] schwarz	weiß	Enth. Mittel	Löslichkeit [%] schwarz	weiß
Na ₂ S	63,5	70	Na ₂ S	64	85,6
Na ₂ O ₂	87,5	95,5	Na ₂ O ₂	85,5	90,5
PES	98	86	PES	84	78
NaBH ₄	42	44,3	NaBH ₄	13	12
ClO ₂	77,4	79	ClO ₂	77,6	78,4
D M A	39	43,5	D M A	24	32,4

Es gilt zweierlei zu diskutieren: Zuerst den Unterschied zwischen Wurzelscheide und Haarwurzel. Sieht man von der Behandlung mit Na_2S ab, bei der bei weißen Wurzelscheiden etwas weniger gelöst wird als bei Wurzeln, so kann man generell sagen, daß von der Wurzelscheide bei allen anderen Enthaarungsmitteln gleich viel oder zu meist mehr in Lösung geht als von der Haarwurzel. Die Unterschiede sind freilich in einigen Fällen nur gering, wie z. B. im Falle der Behandlung mit Chlordioxid. Auch bei der Behandlung schwarzer Wurzelscheiden mit Na-Peroxid wird nur wenig mehr gelöst als bei den Haarwurzeln von schwarzen Haaren. Bei den Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden von weissen Haaren ist der Unterschied größer. Sehr viel größer ist der Unterschied in der Löslichkeit zwischen Haarwurzeln und -wurzelscheiden nach der Behandlung mit Peressigsäure; hier sowohl von schwarzen als auch von weissen. Auch bei der Behandlung mit Dimethylamin wird von der Wurzelscheide mehr gelöst als von der Wurzel. Bemerkenswert ist, wie leicht die Wurzelscheiden von schwarzen Haaren mit Peressigsäure gelöst werden. Man erreicht eine nahezu vollständige Auflösung, nämlich 98 %. Eine ebenfalls sehr gute Auflösung erhält man generell mit Na-Peroxid. Dies haben wir auch schon im ersten Teil unserer Untersuchungen mit Haaren gesehen. Relativ schlecht ist die Auflösung mit Dimethylamin und Natronlauge, sowie mit Natriumborhydrid.

Vergleicht man die Löslichkeit von Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden von schwarzen Haaren mit der der Haare (vergl. Abb. 6; Löslichkeit bei 5 Stunden) so stellt man fest, daß die Haare, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden gleich gut in Natriumsulfid, daß durch Natriumperoxid sowohl Haarwurzeln als Haarwurzelscheiden viel besser und durch Peressigsäure nur die Haarwurzelscheiden besser als Haare gelöst werden.

Betrachtet man nun den Unterschied zwischen den Wurzelscheiden und Haarwurzeln der weissen Haare und der schwarzen Haare, so kann man folgendes feststellen: Mit Ausnahme von Peressigsäure lösen sich in allen Fällen die Haarwurzeln und Wurzelscheiden der weißen Haare besser als die der schwarzen Haare. Nur bei Peressigsäure ist es umgekehrt. Der Unterschied in der Löslichkeit zwischen schwarzen und weißen Haarwurzeln und -wurzelscheiden ist bei Chlordioxid vernachlässigbar klein. In anderen Fällen sind die Unterschiede mehr oder weniger groß, aber im allgemeinen eindeutig.

IV. Bestimmung von Einzelkomponenten aus Haaren, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden

In den bisherigen Untersuchungen war zum Ausdruck gekommen, daß die Strukturen von Haaren, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden ein vielkomponentiges System darstellen. Die Keratinsubstanz selbst ist intracellulär aufgebaut und es sollten daher alle Komponenten einer Zellsubstanz, nämlich Zellmembranen, Plasmabestandteile, Zellkerne, Mitochondrien u.a.m. zumindest teilweise noch, auch wenn die Zellen gealtert und abgestorben sind, vorhanden sein. Neben den Bestandteilen, die man zu den Proteinen rechnen kann, können daher auch noch Zuckerbestandteile, sowie Lipide vorhanden sein. Schließlich ist mit einem erheblichen Anteil an Melaninen zu rechnen, der aber von uns nicht weiter bestimmt wurde. In diesem Abschnitt wird daher über Bestimmungen von Glucose, Glucosamin und von Lipidsubstanzen berichtet. Zusätzlich wird schließlich noch über das Ergebnis einer Versuchsreihe zur Bestimmung von Lanthionin berichtet. Hierbei ergab sich auch gleichzeitig die Möglichkeit, das Cystin mitzubestimmen.

1. Bestimmung von Lanthionin und Cystin

Wie schon einleitend erörtert, beobachtet man bei Auflösungsversuchen mit Enthaarungschemikalien häufig ein Unlöslichwerden. Dieser Vorgang wurde besonders bei den Wasserwerkstattarbeiten, bei denen mit alkalischen Chemikalien gearbeitet wird, beobachtet und ist schon lange bekannt. Er wird auf die Entstehung und Anwesenheit von Lanthionin zurückgeführt. Es handelt sich dabei um eine unerwünschte Nebenreaktion. Da wir bei den im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Auflösungsversuchen aber keineswegs nur immer mit alkalischen Mitteln arbeiteten, war es für uns von Interesse, ob auch unter anderen Reaktionsbedingungen Lanthionin entsteht und es war die Frage zu entscheiden, ob dieses entstehende Lanthionin für die Unlöslichkeit der Rückstände verantwortlich zu machen ist.

Für die Bestimmung des Lanthionins sind in der Literatur verschiedene Methoden beschrieben worden. Man bestimmt das Lanthionin grundsätzlich nach der Totalhydrolyse des Proteins. Die Trennung von den Aminosäuren geschieht meist chromatographisch, die quantitative Bestimmung oft kolorimetrisch.

Sullivan und Mijal [48] beschrieben 1959 eine Methode zur Bestimmung von Lanthionin, bei der Lanthionin mit Bromcyan umgesetzt wird. Der Mechanismus dieser Reaktion ist bisher noch nicht ganz verständlich. Die Reaktion des Bromcyans mit Methionin, Cystin und Cystein, also mit anderen ebenfalls im Keratin vorkommenden Aminosäuren, ist dagegen aufgeklärt [49]. Die Methode einer Bestimmung des Lanthionins über die Umsetzung mit Bromcyan ist aber offenbar unzuverlässig, denn sie wurde in der Zwischenzeit anderweitig nicht verwendet.

Blackburn und Lee [50] haben 1956 Lanthionin in Wollhydrólysaten chromatographisch an Dowex 50 abgetrennt und nach Anfärbung mit Ninhydrin kolorimetrisch bestimmt. Es wird aber auch berichtet, daß diese Methode insofern Nachteile bringt, als sie einerseits einen hohen zeitlichen und apparativen Aufwand bedingt und sich andererseits infolge der Anwesenheit von zwei Diastereomeren zwei sich überlappende Peaks bilden.

Eine weitere Methode wurde von Decroix und Mazinque 1958 [51] angegeben. Diese Methode ist sehr verbreitet. Hierbei wird Lanthionin mit Wasserstoffsuperoxid zum Lanthioninsulfoxid oxidiert. Dieses so modifizierte Lanthionin läßt sich sehr gut papierchromatographisch im System Butanol/Eisessig/Wasser von den anderen Aminosäuren abtrennen. Es läßt sich anschließend kolorimetrisch nach dem Anfärben mit Ninhydrinreagenz quantitativ bestimmen. Diese Methode ist etwas ungenau, da das Ausmaß der Oxidation des Lanthionins durch die Gegenwart von Metallionen und die Gegenwart von Luftsauerstoff während des Chromatographierens beeinflußt wird. Außerdem erfordert die Chromatographie mehrere Tage.

Eine ähnliche Methode ist die von P. Miro und J.J. Garcia Dominguez [52], bei der das Lanthionin als Sulfoxid papierchromatographisch in der einen Richtung und in der zweiten Richtung papierelektrophoretisch abgetrennt wird.

Eine andere Methode, bei der papierchromatographisch das Lanthionin abgetrennt werden kann, ohne es vorher zum Sulfoxid zu oxidieren, stammt von Dowling und Crewter aus dem Jahre 1964 [53]. Nach dieser Methode haben wir gearbeitet, denn sie ist einerseits zuverlässig, andererseits erfordert sie keinen so hohen Zeitauf-

wand wie die anderen Methoden. Man eluiert auf einem großen Papierbogen in 24 Stunden die zu untersuchende Probe und parallel dazu als Referenzsubstanzen Lanthionin- und Cystingemische bekannter Konzentration mit Phenol, Eisessig, Äthanol und Wasser, ermittelt dann nach Anfärben der Streifen, auf denen die Testsubstanzen laufen, die Positionen der gesuchten Substanzen Lanthionin und Cystin, schneidet diese dann aus und extrahiert diese, jede für sich, mit Natriumformiat pH 3,42, setzt Eisessig zu und färbt mit Ninhydrinreagenz an und kolorimetriert bei 450 nm, wobei aus Testsubstanzen bekannter Konzentration eine Eichgerade aufgenommen wird.

Wir untersuchten die Hydrolysate der löslichen und unlöslichen (soweit diese in ausreichender Menge angefallen waren) Anteile von schwarzen und weißen Haarwurzeln bzw. Haarwurzelscheiden, die mit Na_2S , Na_2O_2 und PES behandelt waren. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 wiedergegeben. Sie sind in Prozent, bezogen auf die eingesetzte trockene Hydrolysensubstanz, angegeben. Die Proben, bei denen nicht genügend Substanz zur Lanthioninbestimmung angefallen war, wurden in der Tabelle durch Striche gekennzeichnet. Wie man erkennt, bewegen sich die Mengen im allgemeinen um oder erheblich unter 1 % Lanthionin.

Tab. 6: Lanthioningehalt von Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden

Haarwurzeln		Wurzelscheiden
Art der Substanz	% Lanthionin	% Lanthionin
Na_2S lösl. weiß	0,868	0,655
Na_2O_2 " "	0,166	0,136
PES " "	0,104	0,110
Na_2S lösl. schwarz	1,51	0,934
Na_2O_2 " "	0,183	0,102
PES " "	0,128	0,156
Na_2Sunl lös. weiß	1,005	0,348
Na_2O_2 " "	-	-
PES " "	0,087	-
Na_2Sunl lös. schwarz	0,528	0,161
Na_2O_2 " "	0,256	-
PES " "	0,102	-

Es ist weiter offenkundig, daß anders als erwartet, die unlöslichen Anteile keineswegs prozentual mehr Lanthionin enthalten als die löslichen. Ferner ist erkennbar, daß die mit Na_2S gewonnenen Fraktionen stets einen erheblich höheren Anteil an Lanthionin enthalten als die mit Na_2O_2 und PES gewonnenen Fraktionen. Schließlich erkennt man, daß die aus schwarzen Haaren hervorgegangenen Fraktionen im allgemeinen etwas höhere Lanthioninanteile haben als die aus weißen Haaren hervorgegangenen. Ferner ist erkennbar, daß die Lanthioningehalte der Fraktionen aus Wurzelscheiden, verglichen mit den korrespondierenden Lanthioningehalten von Haarwurzeln, zumeist etwas geringer sind. Zu allerletzt ist festzustellen, daß mit einer Ausnahme der Lanthioningehalt nach Na-Peroxidbehandlung etwas größer ist als nach PES-Behandlung. Der Unterschied ist jedoch nicht so groß, wie zwischen Na-Sulfid einerseits und den beiden Oxydationsbehandlungen andererseits.

Die angewendete Methode bietet die Möglichkeit, gleichzeitig noch Cystin zu bestimmen. Lanthionin ist die am langsamsten wandernde Substanz und sie wird klar getrennt von dem etwas schneller wandernden Cystin, das aber wiederum sich noch deutlich von den folgenden AS absetzt. Deshalb kann das Cystin in gleicher Weise wie das Lanthionin bestimmt werden. Tab. 7 gibt die Ergebnisse und Cystinbestimmungen von Haarwurzeln und Wurzelscheidefraktionen wieder, die nach Behandlung mit Na-Sulfid, Na-Peroxid und PES von Wurzeln und Wurzelscheiden weißer und schwarzer Haare erhalten worden sind. Die Ergebnisse sind in Prozent, bezogen auf die eingesetzte, trockene Hydrolysensubstanz, angegeben. Auch hier sind die Proben, bei denen nicht genügend Substanz zur Cystinbestimmung angefallen war, in der Tabelle durch Striche gekennzeichnet.

Tabelle 7: Cystingehalt von Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden

Haarwurzeln		Wurzelscheiden	
Art	der Substanz	% Cystin	% Cystin
Na ₂ S	lösl. weiß	1,51	0,88
Na ₂ O ₂	" "	0,95	0,86
PES	" "	0,60	0,73
Na ₂ S	lösl. schwarz	1,46	0,75
Na ₂ O ₂	" "	0,71	0,70
PES	" "	0,66	0,83
Na ₂ S	unlös. weiß	2,00	0,96
Na ₂ O ₂	" "	-	-
PES	" "	0,68	-
Na ₂ S	unlös. schwarz	1,17	0,62
Na ₂ O ₂	" "	0,74	-
PES	" "	0,79	-

Aus dieser Tabelle kann man folgendes ablesen: Der Cystin-gehalt ist bei der Mehrzahl der Bestimmungen bei Haarwurzeln etwas größer als bei Wurzelscheiden. Folgerichtig ist er nach der Na-Sulfidbehandlung größer als nach den beiden oxydativen Behandlungen mit Na-Peroxid und PES - sowohl im gelösten als auch im ungelösten Anteil. Ein Unterschied zwischen schwarzen und weißen Haaren kann nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Überraschend ist der nach oxydativer Behandlung immer noch relativ hohe Gehalt an Cystin. Überraschend ist ferner auch, daß in den unlöslichen Rückständen der Cystinanteil noch etwa gleich hoch ist wie in dem gelösten Anteil:

Bei der Bewertung dieser Ergebnisse, speziell bei der Cystinbestimmung, ist es wichtig, keine zu weitgehenden Schlußfolgerungen zu ziehen, weil die Genauigkeit der Cystinbestimmung sicher nicht sehr hoch ist. Die Reproduzierbarkeit der Bestimmungen erreichte etwa im Mittel 10 %. Bei der Lanthioninbestimmung muß man damit rechnen, daß vor allem nach PES-

Behandlung und Na-Peroxidbehandlung ein gewisser Anteil des Lanthionins als Lanthioninoxid vorliegt, was hier nicht erfaßt wird. Eine Bestimmung des Lanthioninoxids wurde versucht, ist aber mißlungen. Bei oxidativer Behandlung muß man gleichfalls erwarten, daß ein großer Anteil des Cystins bzw. Cysteinsulfonsäure umgewandelt wird. Dies geht auch aus den Ergebnissen von Wagner [47] sowie E. Heidemann, F. Hahn und G. Wagner [54] hervor. Hiernach vermindert sich der Halbcystingehalt nach einer Na-Peroxidbehandlung um mindestens 50 %,wahrscheinlich aber bis zu 75 %. Wagner hatte den Halbcystingehalt bzw. den Cystingehalt von mit Enthaarungsmitteln behandelten Haaren polarographisch mit Methylquecksilberjodid in wässriger Lösung bestimmt. Hierbei war aber die Behandlung keineswegs bis zur vollständigen Auflösung der Haare gegangen.

Nach PES-Behandlung von Kalbshautepidermis fand Wagner [47] nur noch etwa 10 - 20 % des ursprünglich vorhandenen Halbcystins. Die absolute Menge an Halbcystin betrug etwa 250 mMol/g mit Na-Peroxid behandelte schwarze Haarwurzel von Kalbshaut. Das entspricht überschlägig gerechnet etwa 2,5 %. In der Größenordnung entspricht dies auch dem von uns gefundenen Wert im mit Na-Peroxid behandelten unlöslichen Material, den wir mit 0,75 % bestimmten. Im gelösten Anteil fanden wir fast 1 % Cystin nach Na-Peroxidbehandlung.

2. Bestimmung von Zuckern

Zucker kommt in vielfältiger Form im Säugetierorganismus vor. So enthält auch die Zelle einen gewissen Anteil an Zucker. Zur Zuckerbestimmung diente uns die Anthronreaktion, die nach einer Vorschrift von Yemm und Willis 1954 [55] ausgeführt wurde. Sie beruht auf einer kolorimetrischen Bestimmung des Zuckers im Hydrolysat des Proteins. Wir hydrolysierten 5 Stunden bei 105° mit 6 n Salzsäure, dampften das Hydrolysat ein und nahmen in Wasser auf. In einem schwer schmelzbaren Reagenzglas wurde unter Eiskühlung mit Anthronreagenz versetzt. auf Siedetemperatur erhitzt und nach Abkühlen die Extinktion bei 625 nm und 700 nm gegen einen Blindwert gemessen. Analog wurden Eichlösungen von Glucose zur Bestimmung der Eichgeraden gemessen.

Wie die folgende Tabelle 8 zeigt, haben wir zunächst unbehandelte Haare, Wurzelscheiden und Haarwurzeln gemessen und Werte von

0.15 - 0.29 % Zucker, bezogen auf eingewogene getrocknete Substanz, erhalten. Die Gesamtmenge ist also relativ gering. Als dann haben wir weiße Haare verschieden lang mit Na-Sulfid, PES und Na-Peroxid behandelt und in den so gewonnenen Rückständen den Zucker bestimmt. Hierbei fanden wir etwas erhöhte Zuckermengen.

Desgleichen haben wir dann auch die unlöslichen und die löslichen Anteile von Wurzelscheiden und Haarwurzeln nach PES- bzw. Na-Sulfidbehandlung gemessen und dabei Werte um 0.4 % erhalten.

Wir sind der Meinung, daß wir keine definierten Unterschiede aufgrund verschiedener Behandlung feststellen können. Die geringfügige Erhöhung der Zuckeranteile in den fraktionierten Keratinsubstanzen ist nicht erklärbar.

Tab. 8

Art der Substanz	% Zuckermenge
weiße Haare unbehandelt	0,15
weiße Wurzeln unbehandelt	0,27
weiße Scheiden unbehandelt	0,29
Na ₂ S, 5 Std. Behandlungszeit, ungelöste weiße Haare	0,33
Na ₂ S, 10 " " "	0,43
Na ₂ O ₂ , 10 " " "	0,63
PES, 5 " " "	0,43
Na ₂ S Wurzelscheide lösl. weiß	0,40
PES Haarwurzel lösl. weiß	0,48
Na ₂ S unlösl. weiße Wurzelscheiden	0,36
PES unlösl. weiße Haarwurzeln	0,42

3. Bestimmung von Aminosukcern

Zur Bestimmung von Aminosukcern benutzten wir die Methode von Elson - Morgan in der Modifikation von C.J.M. Randle und W.T.J. Morgan [56]. Die Bestimmung von Glucosamin nach dieser Methode erfolgt (wie die der Zucker) im Hydrolysat. Das Prinzip der Methode besteht darin, daß die Testmischung mit Acetylaceton zur Reaktion gebracht wird, um aus dem Aminosucker eine farberzeugende Substanz zu machen. Diese wird nun mit dem bekannten

Ehrlich-Reagenz, p-Dimethylaminobenzaldehyd, zu einer farbigen Verbindung umgesetzt, die sich fotometrieren läßt. Die folgende Tabelle 9 zeigt, daß man durchwegs, unabhängig von der Hydrolysedauer, 0.8 - 0.9 Glucosaminhydrochlorid in den Wurzelscheiden findet.

Glucosamingehalt in Abhängigkeit von der Hydrolysedauer bei schwarzen Wurzelscheiden.

Tab. 9

Dauer der Hydrolyse in Std.	% Glucosamin
2	0.9
2	0.9
7	0.8
7	0.8
16	0.9
16	0.8

Aminozucker gelten als charakteristische Bestandteile von Proteoglykanen. In gleicher Weise, wie mit der Anthronreaktion durch Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure aus allen Neutralzuckern, und zwar speziell den Hexosen, ein Furfuolderivat gebildet wird und damit die Hexosen allgemein erfaßt werden, so werden auch die beiden typischsten Vertreter der basischen Zucker, der Hexosamine, das Glucosamin und das Galactosamin mit Hilfe der Elson-Morgan-Reaktion erfaßt. Normalerweise kommen die Hexosamine in den Glycoproteinen in der N-acetylierten Form vor. Sie sind einerseits in Kohlenhydrateinheiten über glykosidische Bindungen eingebaut, andererseits sind sie auch über das C₁ an Glykopeptidbindungen beteiligt. Hexosamine sind im allgemeinen resistenter gegen Hydrolyse als einfache Zucker. Sie werden jedoch im gleichen Maße, wie die Säurehydrolyse ausgedehnt wird, stärker zerstört, besonders unter den Bedingungen, unter denen sonst die Aminosäuren freigesetzt werden. Aus dem Grunde haben wir auch wesentlich kürzere Hydrolysezeiten angewendet als sie für die Aminosäurebestimmung normalerweise erforderlich sind. Glykoproteine werden normalerweise mit 4 n

Salzsäure 4 - 8 Std. bei Siedetemperatur in geschlossenen Kölbchen hydrolysiert.

Abgesehen von dem positiven Ausfall der Elson-Morgan-Reaktion, können die Hexosamine papierchromatographisch durch Anfärbung mit Ninhydrin nachgewiesen werden. Sie können auch N-acetyliert werden und dann chromatografiert, elektrophoretisch getrennt und schließlich kolorimetrisch nachgewiesen werden. Man findet sie auch in der Aminosäureanalyse, worauf wir später noch zu sprechen kommen werden.

Der positive Ausfall der Elson-Morgan-Reaktion deutet darauf hin, daß man in dem vielkomponentigen System von Haar, Haarwurzel und Wurzelscheide mit derartigen Substanzen rechnen muß, wenn, wie bei den Glykoproteinen, Glucosamin eingebaut ist. Hierbei handelt es sich um Substanzen, die mit den Zellmembranen aggregiert sein können. Dann gehören diese Glykoproteine zu der Typ der unlöslichen, mehr strukturbildenden Typen. Die von uns unternommenen Versuche sagen jedoch nichts aus, ob sie zu diesen eben genannten gehören oder mehr zu denen, die ebenfalls von hohem MG sind, die sich aber durchwegs in einem flüssigen Aggregatzustand befinden, wie sie z.B. in den Synovialflüssigkeiten der Gelenke von Säugetieren vorkommen. Die Menge von immerhin etwa 1 % Glucosaminhydrochlorid deutet darauf hin, daß es sich hierbei doch um einen ganz wesentlichen Bestandteil der Haarwurzelscheidensubstanz handelt.

4. Lipidbestimmung

Das Vorkommen von Zellmembranen brachte uns auf den Gedanken, die oft mit Membranen vergesellschaftet auftretenden, Lipide nachzuweisen. Hierbei bedienen wir uns einer einfachen Methode, die in dem Buch "Dünnschichtchromatographie" von G. Stahl [57] angegeben ist. Zunächst wurde von der Haarwurzelscheidensubstanz ein Homogenisat in Wasser hergestellt und dieses mit Chloroform-Methanol 2:1 bei Zimmertemperatur über eine längere Zeit extrahiert. Es wurde vom Unlöslichen abzentrifugiert, noch einmal mit Wasser gewaschen und der Lipidextrakt eingeeengt, getrocknet und ausgewogen. In zwei Parallelbestimmungen fanden wir übereinstimmend die Menge von 12.6 und 12.3 %. Zur Bestimmung der Lipide war von über Phosphorpentoxid konstant getrocknetem Material ausgegangen worden.

Diese Lipidmengen sind überraschend hoch und sie geben uns Aufschluß über die oft sehr hohen Nichtproteinanteile, die wir bei Analysen, auf die wir später zurückkommen werden, beobachten. Der hohe Lipidanteil mag auch darauf zurückgeführt werden können, daß Talgdrüsensubstanzen beim Herausreißen der Haarwurzeln aus den Haarfollikeln mit in die Wurzelscheidefraktionen gelangten. Der obere Teil der Haarwurzeln ist auch von Talgdrüsen umhüllt.

V. Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von unbehandelten und behandelten Keratinsubstanzen

1. Aminosäure-Analyse

Nachdem wir im vergangenen Kapitel die Ergebnisse von Einzelanalysen einiger Nebensubstanzen der Haare, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden besprochen haben, soll nun die Zusammensetzung der Proteinsubstanzen besprochen werden. Die Aminosäureanalyse dient hierbei als beste Methode zur Charakterisierung der molekularen Zusammensetzung. Sie dient auch zur Analysierung der Veränderungen, die durch oxydative und reduktive Haarauflösungsprozesse erfolgt sind und die sich in der Zusammensetzung der unlöslichen und der löslichen Fraktionen ergeben.

Im Haarkeratin haben wir, wie das folgende Aminosäurediagramm zeigt, insgesamt 22 verschiedene Aminosäuren beobachtet (Abb. 25). Die erste Gruppe der neutralen und sauren Aminosäuren, die an der langen Säule des Beckman Aminosäureanalysators Uni-chrom getrennt wird, ist die von Cysteinsäure bis zur Phenylalanin. Die zweite Gruppe reicht von Galactosamin bis Arginin.

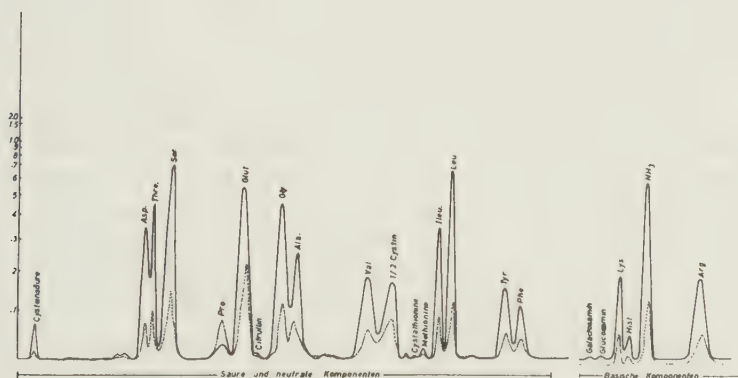


Abb. 25: Aminosäurediagramm

Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung erfolgte nach der bekannten Methode von Moore und Stein [58]. Hierzu werden die Aminosäuren, die man aus einem Proteinhydrolysat durch Hydrolyse mit 6 n Salzsäure bei 105° in 24 Stunden gewinnt, auf eine Säule von Kationenaustauscherharz aufgetragen und dort mit 2 verschiedenen Puffern nacheinander und unter Verwendung von zwei verschiedenen Temperaturen entwickelt. Das Eluat wird durch einen Zustrom von Ninhydrin angefärbt, und der dabei entstehende Farbstoff in einer Durchflußzelle vermessen und mit einem Punktdrucker notiert. Aus Höhe und Halbwertsbreite der Peaks kann im Vergleich mit Eichsubstanzen die Konzentration der Aminosäuren im allgemeinen mit einer Genauigkeit von 2 - 5 % bestimmt werden. Für die Ausführung der Aminosäureanalysen danke ich Fräulein Hildegard Kröll.

Tab. 10 zeigt die Aminosäurezusammensetzung von Haaren, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden, getrennt nach schwarzen und weißen Haaren. Sie zeigt ferner die unlöslichen und die löslichen Fraktionen von mit Peressigsäure behandelten Haaren, Haarwurzeln und Wurzelscheiden, sowie einige der mit Na-Sulfid und Dimethylamin behandelten Substanzen. Es sind keineswegs alle Variationen, die in dieser Hinsicht denkbar sind und die auch als Substanz gewonnen wurden, auf die Aminosäurezusammensetzung untersucht worden wegen des großen Aufwandes, den derartige Analysen bereiten.

Es hat sich nämlich in der mehrjährigen Praxis des Institutsbetriebes herausgestellt, daß Aminosäureanalysen mindestens doppelt, besser aber bis zu 4mal ausgeführt werden müssen, um zuverlässige Werte zu erhalten. Ein Bild über die Reproduzierbarkeit der Werte, die hier im allgemeinen anfallen, ergibt folgende Tabelle 11, die die Werte für schwarze unbehandelte Haarwurzelscheiden aufzeigt. Wie man erkennt, können die Werte bis zu 1 % absolut schwanken. Naturgemäß bedeutet diese Schwankung bei denjenigen Aminosäuren, die in einer höheren Konzentration vorliegen, wie z.B. Glutaminsäure, Lysin oder Asparaginsäure sowie Glycin, weniger Verlust an Genauigkeit als bei denjenigen, die in niedriger Konzentration vorliegen, wie z.B. bei den Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin, Histidin.

Tab. 11: Aminosäureanalyse der unbehandelten schwarzen
Haarwurzelscheiden

Aminosäuren	Analyse Nr. 1	Analyse Nr. 2	Aminosäuren	Analyse Nr. 1	Analyse Nr. 2
Asp	7,77	8,42	Meth	0,43	1,12
Thre	4,67	4,96	Ileu	4,12	3,99
Ser	7,23	8,20	Leu	9,45	9,26
Pro	6,60	5,59	Tyr	2,53	2,50
Glut	11,94	13,92	Phe	3,30	3,37
Gly	13,00	9,54	Cysteinsäure	0,97	0,28
Ala	8,13	7,78	Lys	6,07	7,19
Cyst	-	-	Hist	1,98	2,05
Val	5,50	5,38	Arg	6,05	5,20
			Citrullin	Spuren	Spuren

Aus der Tabelle 10 erkennt man nun, wenn man die Aminosäurezusammensetzung von schwarzen Haaren mit der von schwarzen Haarwurzeln bzw. weißen Haarwurzeln vergleicht, daß Glutaminsäure und Tyrosin bei den Haarwurzeln im allgemeinen in höheren Konzentrationen vorliegen, während Prolin in niederer Konzentration vorliegt. Auch Glycin und Alanin liegen in etwas niederer Konzentration vor. Hieraus ist zu sehen, daß bei einer außerordentlichen Ähnlichkeit der Aminosäurezusammensetzung zwischen Haar und Haarwurzeln doch zwischen beiden ein deutlicher Unterschied besteht.

Tab. 10

Aminosäuren	unbehandelt				mit Peressigsäure behandelt				m. Na ₂ S behand.		m. DMA behand.			
	Haar	Haarwurzel	H.W.Sch.	Haar	Haarwurzel	H.W.Sch.	Haar	H.W.Sch.	Haar	H.W.Sch.	H.W.Sch.	H.W.Sch.		
	schwarz schwarz weiß schwarz weiß schwarz schwarz weiß schwarz schwarz weiß schwarz schwarz schwarz				schwarz schwarz weiß schwarz schwarz weiß schwarz schwarz weiß schwarz schwarz schwarz				schwarz schwarz weiß schwarz schwarz schwarz schwarz					
	unlöslich		löslich		unlöslich		löslich		unlöslich		löslich			
Asp	5,81	6,09	6,16	8,42	8,84	5,83	6,99	6,98	7,17	10,67	9,23	4,99	9,39	7,94
Thre	5,75	6,32	5,82	4,96	5,72	6,86	6,39	5,98	6,55	5,31	5,68	6,09	5,53	5,06
Ser	9,40	9,13	9,04	8,20	7,94	11,17	11,07	10,92	11,34	9,13	9,10	12,13	9,14	7,42
Pro	7,56	6,20	5,80	5,59	5,97	8,17	8,11	8,09	7,39	4,43	4,65	9,10	4,60	4,05
Glut	9,60	11,33	11,34	13,92	13,83	12,61	12,93	14,35	11,15	12,86	13,46	11,13	10,65	9,43
Gly	9,46	8,33	8,74	9,54	9,20	7,33	7,10	6,71	10,70	9,40	8,89	8,91	7,55	10,10
Ala	6,04	5,15	5,22	7,78	6,92	5,61	5,74	5,92	4,96	7,43	7,63	5,31	6,59	7,83
Cyst	12,37	11,93	12,04	-	-	2,18	-	-	-	-	-	7,20	-	-
Val	6,02	5,53	5,36	5,38	5,45	5,88	4,98	5,37	5,41	4,87	5,17	7,24	4,83	4,82
Meth	0,35	0,33	0,42	1,12	1,00	0,36	0,30	0,41	-	-	-	0,45	0,18	0,30
Ileu	3,47	3,68	3,27	3,99	4,94	3,17	3,16	3,20	3,50	3,72	3,72	2,69	3,83	3,79
Leu	7,70	7,65	8,75	9,26	8,19	7,27	7,52	7,88	7,90	8,94	9,05	6,16	8,88	8,44
Tyr	3,04	3,32	4,16	2,50	2,73	2,32	2,49	2,46	0,32	2,20	2,34	1,88	2,16	2,20
Phe	2,48	2,05	2,14	3,37	2,88	1,98	2,06	2,15	2,55	2,97	2,83	1,97	2,86	3,13
Cystein- säure	0,46	-	-	0,28	-	5,61	7,47	6,94	12,40	2,76	3,98	1,26	2,32	1,08
Lys	2,82	3,47	2,31	7,19	6,53	2,72	3,14	2,99	1,34	5,89	5,59	3,46	5,76	5,82
Hist	0,93	0,87	0,83	2,05	1,63	0,90	2,15	0,88	6,38	1,75	1,54	1,18	1,60	2,48
Arg	6,85	6,79	5,97	5,20	6,05	6,51	6,54	6,54	7,06	6,12	5,66	5,02	6,03	4,44
Nitrol	Spur.	Spur.	Spur.	Spur.	Spur.	Spur.	Spur.	0,14	-	Spur.	Spur.	Spur.	-	-

Vergleicht man nun die Aminosäurezusammensetzung der Substanzen der Haarwurzelscheide mit denen von Haar und Haarwurzel, so fällt zunächst auf, daß die Haarwurzelscheide kein Cystein enthält. Es enthält dafür Spuren von Cysteinsäure. Dies war außerordentlich überraschend, muß man sich doch angesichts dieses Befundes fragen, ob die Proteine der Haarwurzelscheide überhaupt noch als Keratine anzusprechen sind, da ja die charakteristische Aminosäure der Keratine das Cystein ist. Dennoch kann aber festgestellt werden, daß die Aminosäurezusammensetzung prinzipiell ähnlich ist wie bei den Haaren und den Haarwurzeln. Dennoch gibt es auch hier wiederum charakteristische Unterschiede. Diese Unterschiede sind, wenn man die Zahlen absolut, so wie sie in der Tabelle 10 beschrieben sind, in Vergleich setzt, sogar ziemlich zahlreich. Es sind nämlich die Aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin, Methionin, Isoleucin, Leucin und Phenylalanin, sowie vor allen Dingen Lysin und Histidin in einer etwas höheren Konzentration vertreten, während Serin, Prolin, Tyrosin und Arginin in einer etwas niederen Konzentration vertreten sind. Bei einer kritischen Betrachtung erkennt man aber, daß die in höherer Konzentration vertretenen Aminosäuren alle durchwegs um einen einigermaßen vergleichbaren Betrag in dieser Konzentration heraufgesetzt sind. Dies liegt zweifellos daran, daß das Cystein fehlt. Durch das Fehlen des Cysteins erhöht sich nämlich automatisch der prozentuale Anteil aller anderen Aminosäuren oder umgekehrt, wenn man Aminosäuren in geringerer Konzentration beobachtet, so ist die Sicherheit, daß die Aminosäuren wirklich in geringerer Konzentration vorliegen, angesichts der Tatsache, daß ja eine indirekte Erhöhung bei diesen Werten drinsteckt, umso größer.

Wir erkennen also zusammenfassend, daß die Proteine der Haarwurzelscheide denen von Haaren und Haarwurzeln außerordentlich ähnlich sind, charakterisiert eben durch ein ganz typisches Konzentrationsspektrum der einzelnen Aminosäuren: Hoher Gehalt an Glutaminsäure und Asparaginsäure, ein hoher Gehalt an Glycin und Serin, ein niederer Gehalt an Prolin, ein relativ hoher Gehalt an Leucin, ein geringer Gehalt an Histidin, Phenylalanin und Tyrosin.

Der bemerkenswerte Unterschied der Haarwurzelscheidenproteine zu Haarwurzeln und Haaren liegt in einer ausgesprochen starken Erhöhung der Lysinkonzentration, sowie einer deutlichen Erhöhung der Glutaminsäure- und Asparaginsäurekonzentration.

Am Beispiel der Peressigsäurebehandlung kann am besten gezeigt werden, in welcher Weise die einzelnen Aminosäuren in den einzelnen Fraktionen der verschiedenen Proteine angereichert werden, nämlich entweder im unlöslichen oder im löslichen Anteil. Bei dem Beispiel der Natriumsulfid- und dem der Dimethylaminbehandlung sind die Vergleichsmöglichkeiten geringer, weil weniger Analysen gemacht wurden. Wir haben jedoch herausgefunden, daß es offenbar sinnvoller ist, den Vergleich für jede Keratinsubstanz für sich vorzunehmen. Das bedeutet; Wir vergleichen die Zu- oder Abnahme bestimmter Aminosäuren nach der Behandlung mit verschiedenen Enthaarungsmittelchen einmal von Haaren, zum anderen von Haarwurzeln und zuletzt von Haarwurzelscheiden.

Wir konnten die im folgenden angeführten Veränderungen der Aminosäurezusammensetzung feststellen:

Für schwarze Haare

in der unlöslichen Fraktion nach der Peressigsäurebehandlung

Z u n a h m e: Threonin, Serin (Pro. und Glut)

A b n a h m e: Gly , Cyst , (Tyr) und Cysteinsäure,

in der unlöslichen Fraktion nach der Natriumsulfidbehandlung

Z u n a h m e: Serin, Prolin, Glut , Valin

A b n a h m e: Cyst , Ileu , Leu , Tyr , Cysteinsäure, Arg.

Für schwarze Haarwurzeln

in der unlöslichen Fraktion nach der Peressigsäurebehandlung

Z u n a h m e: Serin, Pro , Glut , Cysteinsäure

A b n a h m e: Gly , Cyst.

in der löslichen Fraktion nach der Peressigsäurebehandlung

Z u n a h m e: Ser , Pro , Gly , Hist , Cysteinsäure

A b n a h m e: Cyst , Meth , Tyr , Lys.

Für weiße Haarwurzeln

in der unlöslichen Fraktion nach der Peressigsäurebehandlung

Z u n a h m e: Ser , Pro , Glut , Cysteinsäure, Citrullin

A b n a h m e: Gly , Cyst , Tyr.

Für schwarze Haarwurzelscheiden

in der löslichen Fraktion nach der Peressigsäurebehandlung

Z u n a h m e: Asp , Serin

A b n a h m e: Pro , Lys.

in der löslichen Fraktion nach der Natriumsulfidbehandlung

Z u n a h m e: Ser, Asp.

A b n a h m e: Pro, Glut, Gly, Lys.

in der löslichen Fraktion nach der DMA-Behandlung

Z u n a h m e: keine

A b n a h m e: Pro, Glut, Lys.

Venn man nun die Veränderungen z. P. durch Peressigsäurebehandlung diskutieren will, so kann man zusammenfassend erkennen, daß in dem Peressigsäureunlöslichen stets die Konzentration an Serin und Glutaminsäure erhöht ist. Bei Haarwurzeln kommt dazu noch ein erhöhter Prolingehalt. Erniedrigt ist durchweg die Glycinkonzentration, z.T. aber auch Tyrosin. Selbstverständlich ist die Konzentration an Cystein drastisch reduziert, bei den Haarwurzeln ist das Cystein überhaupt nicht mehr nachweisbar. Dafür ist naturgemäß der Gehalt an Cysteinsäure stark angestiegen.

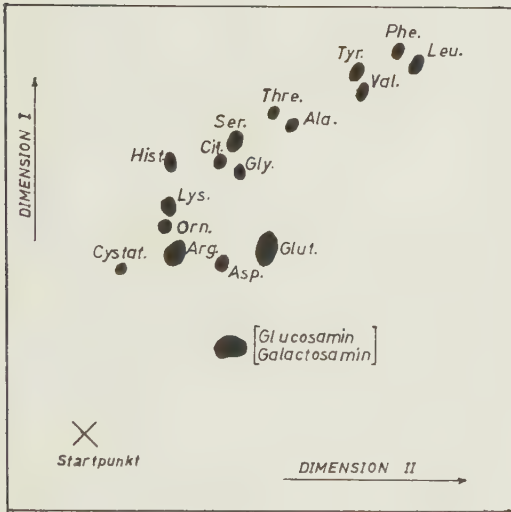
Bei dem löslichen Anteil der Peressigsäurebehandlung, der nicht bei Haaren, sondern nur bei Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden untersucht wurde, erhöht sich der Glycingehalt ebenfalls, der Prolin- und Seringehalt etwas. Bei Haarwurzelscheiden ist es wiederum Serin und vor allen Dingen Asparaginsäure, während sich dort die Prolinkonzentration eindeutig vermindert. Charakteristisch zu sein scheint, daß sich bei schwarzen Haarwurzeln im löslichen Anteil die Lysinkonzentration und Tyrosinkonzentration ganz wesentlich erniedrigen. Auch in dem peressigsäurelöslichen Anteil der Haarwurzelscheide ist die Lysinkonzentration stark heruntergegangen. Diese Abnahme des Lysingehaltes scheint aber durchwegs mit dem Inlösegehen schlechthin zusammenzuhängen, denn auch die in Natriumsulfid lösliche sowie die in Natronlauge-Dimethylamin lösliche Fraktion zeigen einen ausgesprochen verminderten Gehalt an Lysin, aber auch an Prolin und Glutaminsäure.

Abschließend sei noch vermerkt, daß auch der in Natriumsulfid unlösliche Anteil von schwarzen Haaren diese typische Anreicherung an Serin, Prolin, Glutaminsäure besitzt, wie wir das auch in dem peressigsäureunlöslichen Anteil gesehen haben. Das bedeutet, daß es offenbar weniger wichtig ist, ob die Fraktionierung in lösliche und unlösliche Anteile mit oxydativen oder mit reduktiven Mitteln erfolgt, sondern daß es schlechthin mehr lösliche und schlechthin mehr unlösliche Verbindungen gibt, die relativ wenig

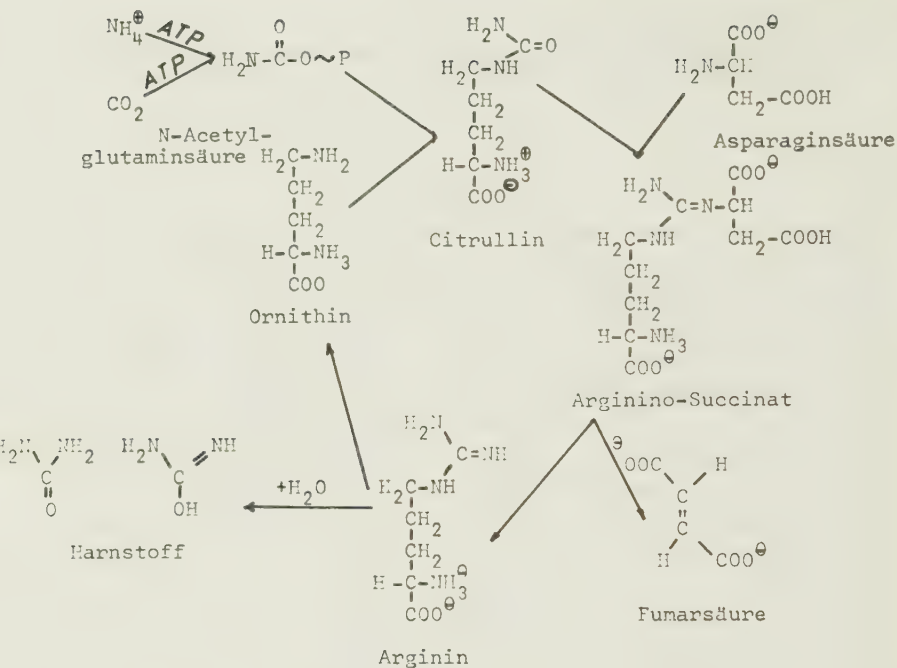
spezifisch auf oxydative, saure oder reduktive, alkalische Mittel reagieren. Sie zeigen auch charakteristische Anreicherung bzw. Verarmung an bestimmten Aminosäuren, wie soeben auseinandergesetzt wurde.

Das Aminosäureanalyse-Elutionsdiagramm zeigt bei den meisten Substanzen ferner eine Schulter auf der Auslaufseite des Glutaminsäurepeaks, also auf der Seite, die der nachfolgenden Aminosäure, dem Glycin, zugewandt ist. In der Literatur wurde von Rogers [59] beschrieben, daß man in den Proteinen der Haarwurzel-scheiden mit der Aminosäure Citrullin rechnen könne. Wir haben in einem Testgemisch die Aminosäure Citrullin zugesetzt bzw. das Citrullin neben Glycin und Prolin laufen lassen und haben dabei einen Peak an derselben Stelle, wo die Schulter am Glutaminsäure-peak auftritt, beobachtet. Bei Variation der Pufferbedingungen bei Einstellung des pH-Wertes gelingt es auch, eine Trennung des Citrullinpeaks von Glutaminsäure zu erreichen. Der Nachweis bzw. die Festätigung des Befundes von Rogers [59] gelingt auch mit Hilfe einer zweidimensionalen Aminosäuredünnschicht-chromatographie in einer Ausführungsform, wie sie in allerjüngster Zeit von der Fa. Merck ausgearbeitet und empfohlen wird. Man benutzt hierzu Cellulose-Dünnschichtplatten ohne Fluoreszenz-indikator. Als Laufmittel verwendet man für die erste Dimension ein alkalisches Laufmittel der Zusammensetzung: Pyridin + Dioxan + NH_3 + H_2O = 35 + 35 + 15 + 15, für die zweite Dimension ein saures Laufmittel der Zusammensetzung: n-Butanol + Aceton + Essigsäure (99%ig) + Wasser = 14 + 14 + 3 + 9. Die Reproduktion einer derartigen qualitativen Aminosäureanalyse gibt die folgende Abbildung, wo der Citrullinfleck markiert wurde.

Abb. 26: Dünnschichtchromatographische Trennung der Aminosäuren des Hydrolysats der unbehandelten Haarwurzelscheide



Der Nachweis von Citrullin in den Proteinen der Haarwurzelscheiden überrascht zunächst. Es ist nämlich bekannt (vergl. Lehrbuch T. Karlson [60]), daß Citrullin eine wichtige Substanz im Pool des Harnstoffzyklus ist. Aus N-Acetylglutaminsäure entsteht Carbamylphosphat, das sich an Ornithin zum Citrullin anlagert.



An das Citrullin lagert sich 1 Molekül Asparaginsäure an, aus dem sich Fumarsäure abspaltet und Arginin zurückbleibt. Dieses spaltet dann Harnstoff ab, wobei wieder Ornithin im Zyklus entsteht. Dieser Zyklus hat offenbar den Sinn, Stickstoff aus dem Organismus auszuschleiden. Es ist ja bekannt, daß Harnstoff ein Bestandteil des menschlichen Schweißes ist. Es ist nur verwunderlich, daß dieses Citrullin nicht in Haarwurzelsubstanzen oder haftend an den Haaren oder dort drin gelöst, sondern nur an Haarwurzelscheidenproteinen gefunden wird.

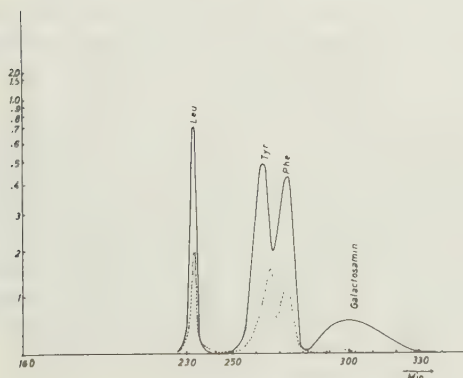
Dieser dem Ausscheiden von Harnstoff dienende Zyklus legt folgende Vermutung nahe, sollte nicht auch in der gleichen Weise wie Citrullin festgestellt wird, Ornithin nachzuweisen sein. Wir haben daraufhin unsere Aminosäureanalysen überprüft und haben gefunden, daß man nach der Methode Stein und Moore [58] das Ornithin stets zusammen mit dem Lysin von den Säulen eluiert. Es kann also auf diese Weise nicht getrennt werden. Wir haben darauf in der qualitativen Dünnschichtchromatographie, wie wir sie oben schon erwähnten, als Testsubstanz Ornithin und Lysin zusammenlaufen lassen und entdeckten einen eigenen Ornithinfleck (Abb. 26). Dadurch erklärt sich der hohe Ly-

sinanteil in der Aminosäureanalyse der Haarwurzelscheiden.

2. Nachweis von Hexosaminen

In dem vorhergehenden Abschnitt hatten wir nach Rondle und Morgan [56] die Konzentration an Hexosaminen, nämlich Glucosamin und Galactosamin, bestimmt, und zwar in einer Konzentration von zusammen etwa 0.8 - 0.9 %. Glucosamin und Galactosamin kann man auch in den sauren Hydrolysaten der Aminosäuren mit der quantitativen Aminosäureanalyse nach Stein und Moore [58] bestimmen. Es tritt, wie Analysen mit Testsubstanzen zeigten und auch wie es in der Literatur angegeben ist, bei dem Lauf der basischen Aminosäuren vor Lysin bzw. Ornithin auf (siehe Abb. 25) und wurde von uns ursprünglich mit Hydroxylysin verwechselt. Eine qualitative Prüfung der Aminosäurezusammensetzung mit der Cellulose-Dünnschichtchromatographie ergab jedoch, daß an der Stelle, an der Hydroxylysin erscheinen sollte, kein Fleck auftrat. Es müßte sich bei den Peaks der quantitativen Aminosäureanalysen infolgedessen um Glucosamin handeln. Aber nicht nur bei der Analyse der basischen Aminosäuren, sondern auch bei der Analyse der sauren Aminosäuren beobachtet man Galactosamin und Glucosamin. Diese beiden Aminosäuren werden zu allerletzt von der langen Säule der Kationenaustascherharze eluiert, und zwar mit Tyrosin und Phenylalanin zusammen kommt zunächst Glucosamin, und davon deutlich abgesetzt, Galactosamin (siehe Abb. 27).

Abb. 27: Testlauf eines Gemisches von Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Glucosamin und Galactosamin (ohne Glucosamin ist der Tyrosin- und Phenylalanin-Peak deutlich dünner)



Die Konzentration an Glucosamin und Galactosamin war in unseren Substanzen recht klein. Eine quantitative Bestimmung mit Hilfe des Aminosäurediagramms gelang nicht. Wir haben Glucosamin und Galactosamin aufgrund der beobachteten Peaks qualitativ nachgewiesen und haben in einigen Fällen die Konzentration abschätzen können.

Unbehandelte Haarwurzelscheiden enthalten nur Spuren an Glucosamin und deutlich mehr Galactosamin. Der peressigsäurelösliche Anteil von schwarzen Haarwurzelscheiden enthält deutlich mehr Glucosamin als die unbehandelten Haarwurzelscheiden. Bei weißen Haaren ist die Konzentration an Glucosamin deutlich größer als die der löslichen Fraktion der Natriumsulfidbehandlung von schwarzen Haaren. Besonders hoch ist die Konzentration in dem löslichen Anteil der mit Dimethylamin-Natronlauge gewonnenen löslichen Fraktion von schwarzen Haarwurzelscheiden. Er konnte abgeschätzt werden zu etwa 0.2 %. Der Galactosamingehalt ist im allgemeinen größer als der von Glucosamin. Es wurde in dem peressigsäurelöslichen Anteil der weißen Haarwurzelscheiden auch ein deutlich höherer Galactosamingehalt erhalten als der Glucosamingehalt. Dasselbe gilt für den nach Na-Sulfidbehandlung anfallenden löslichen Anteil der schwarzen Wurzelscheiden. Auch nach Dimethylaminbehandlung enthält der lösliche Anteil der schwarzen Haarwurzeln mehr Galactosamin als der nach Na-Sulfidbehandlung anfallende lösliche Anteil.

Aber nicht nur in den Haarwurzelscheidenproteinen findet man Glucosamin und Galactosamin, sondern auch, wie wir oben schon gezeigt haben, in den unbehandelten Haaren sowie in den daraus gewonnenen Fraktionen. So ist z.B. in dem unlöslichen Anteil nach der Peressigsäurebehandlung von Haaren Glucosamin in der Konzentration von abgeschätzt etwa 0.18 % enthalten. Auch der Galactosamingehalt ist größer in dem peressigsäureunlöslichen Anteil der Haare als in dem unbehandelten Anteil. Auch hierbei findet man wieder die Gesetzmäßigkeit, daß in dem unlöslichen Anteil der Na-Sulfidbehandlung mehr Galactosamin enthalten ist als in dem peressigsäureunlöslichen Anteil. Glucosamin dagegen wird etwas weniger in dem unlöslichen Anteil der Na-Sulfidbehandlung gefunden als in dem der Peressigsäurebehandlung.

Diese Ergebnisse bestätigen die Schlußfolgerungen, die wir in dem vorhergehenden Abschnitt gezogen haben. Man muß hiernach mit Sicherheit mit Glucosamin und noch mehr mit Galactosamin in der Keratinsubstanz rechnen und das bedeutet, daß wir offenbar Substanzen vorliegen haben in diesem vielkomponentigen System der Haare, der Haarwurzelscheiden und der Haarwurzeln, die den Proteoglykanen zuzurechnen sind.

3. Nachweis von Cystathionin

Eine genaue Beobachtung der Aminosäureanalysediagramme ließ bei sehr vielen Analysen einen typischen kleinen Peak bzw. eine Unruhe in der Basislinie zwischen Halbcystin und Methionin erkennen. Aufgrund eines Testlaufes und vor allem aufgrund von Angaben aus der Literatur (Angaben in der Gebrauchsanleitung des Beckman-Aminosäureanalysators, Abb. 12b), muß Cystathionin an dieser Stelle zwischen Halbcystin und Methionin in der Aminosäureanalyse kommen. Die Abb. 25 läßt erkennen, daß bei unbehandelter Haarwurzelscheide ein recht deutlicher kleiner Peak, der sich allerdings nicht quantitativ auswerten läßt, erscheint.

Die anderen Substanzen, wie z.B. die löslichen Anteile von weisser und schwarzer Haarwurzelscheide nach Peressigsäurebehandlung sowie die löslichen Anteile nach Natriumsulfid- und Dimethylamin-Natronlaugebehandlung ergaben nur Spuren. Deutlicher war der Nachweis schon möglich bei den behandelten Haaren, während die unlöslichen Fraktionen von Peressigsäure- und Natriumsulfidbehandlung von Haaren ebenfalls nur Spuren ergaben. Auch Haarwurzeln ergaben in dem unlöslichen Anteil der Peressigsäurebehandlung nur Spuren, während wiederum der Nachweis in der unbehandelten Haarwurzel etwas deutlicher zu sein schien.

Cystathionin tritt als Zwischenprodukt bei dem Stoffwechsel des Serins und Cysteins auf (vergl. T. Karlson [60]). Aus Methionin entsteht durch Demethylierung Homocystein. Dieses setzt sich mit Serin zu Cystathionin um. Durch Angriff eines Enzyms entsteht hieraus aus dem ursprünglich dem Serin zugehörigen Teil des Moleküls das Cystein, während sich Homoserin abspaltet. Dieses wird oxydativ desaminiert und zu α -Ketobuttersäure und später zu Propionsäure umgesetzt.

Cystathionin ist also die Schlüsselsubstanz zur Entstehung des Cysteins, und es ist nicht verwunderlich, daß wir in den Keratinstubstanzen der Haarwurzelscheide sowie der Haarwurzel und der Haare Cystathionin gefunden haben. Bemerkenswert ist hierbei, daß die Konzentration des Cystathionins offenbar in der Haarwurzelscheide relativ hoch ist und auch deutlich größer ist als bei den Haaren. In den Haarwurzeln selbst wurde noch am wenigsten Cystathionin gefunden. Wie weit man hieraus folgern kann, daß die Cysteinbildung mehr in den Zellen der Wurzelscheiden erfolgt, ist noch eine offene Frage und bedarf weiterer Untersuchung.

4. Bestimmung der Nichtproteine in Haarwurzelscheiden, -wurzeln und Haaren

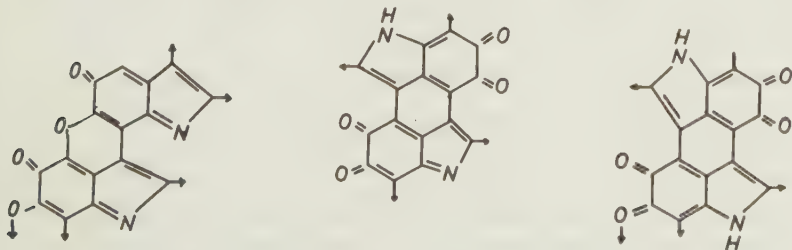
Die von uns vorgenommenen quantitativen Bestimmungen der Aminosäureanalyse wurden von Anfang an darauf ausgelegt, auch hiermit nicht nur das relative Verhältnis der Aminosäure zueinander zu bestimmen, sondern möglichst quantitativ über den absoluten Gehalt an Aminosäure den Proteinanteil in der jeweiligen Substanz zu erfassen. Dies bedingt eine möglichst genaue Berechnung der Anfärbeintensität des Ninhydrinreagenzes. Es konnte nur in der Weise ermittelt werden, daß man jeweils die zu untersuchende Substanz in der Reihenfolge zwischen zwei Testläufe legte. Das Ninhydrinreagenz verändert sich nämlich fortlaufend in seiner Anfärbewirkung. Diese nimmt ab, was durch Korrekturfaktoren ausgeglichen wird. Durch Interpolation zwischen Testläufen auf die betreffende Aminosäureanalyse der unbekannten Substanzen gelang es uns, eine annähernd quantitative Bestimmung der Nichtproteinanteile zu erreichen. Wir fanden dabei, daß bemerkenswerterweise der Nichtproteinanteil der Haarwurzelscheidensubstanz zwischen minimal 40 % und maximal 60 % liegt. Bei Haarwurzeln wurde sehr viel weniger Nichtprotein gefunden, geschätzt etwa 20 %. Bei den Haaren betrug der Nichtproteinanteil zwischen 10 und 20 %.

Naturgemäß findet man dann auch in den löslichen und unlöslichen Fraktionen der Haarwurzelscheiden ebenfalls einen relativ hohen Gehalt an Nichtproteinen. Da wir von den Haarwurzelscheiden nach Peressigsäure-, Natriumsulfid- und Dimethylaminbehandlung keine unlöslichen Fraktionen untersucht haben, können wir keine Angabe darüber machen, ob in den unlöslichen Fraktionen ebenfalls hohe Nichtproteinanteile vorhanden sind. Lösliche Fraktionen zeigen

Nichtproteinanteile zwischen 30 und 60 %. Besonders hoch mit 57 % war der Anteil in der mit Natronlauge und Dimethylamin behandelten Haarwurzelscheide. Dies deutet darauf hin, daß besonders unter den stark alkalischen Bedingungen dieser Behandlung deutlich mehr Nichtproteine herausgelöst werden.

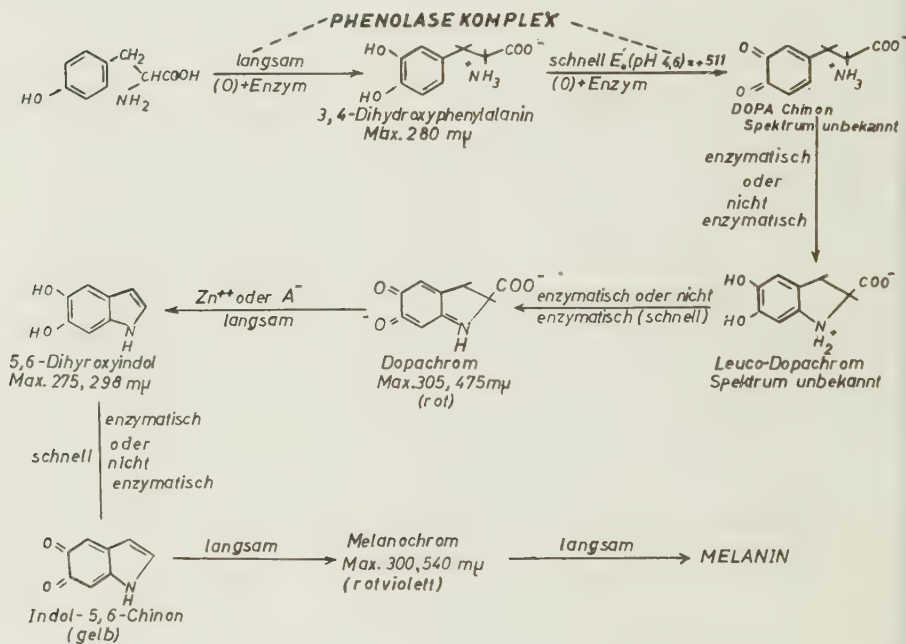
Der hohe "Nichtproteinanteil" ist nicht nur auf das Vorkommen von Lipiden, die bei Haarwurzelscheiden einen Anteil von etwa 13 % ausmachen, zurückzuführen. Einen hohen Prozentsatz am "Nichtproteinanteil" haben Zellmembranen, die durch die üblichen Keratinlösungsmittel nur schwer angegriffen werden. Während die Proteine des Zellinhalts durch Keratin lösende Agenzien leicht gelöst werden, bleibt die Zellmembran ungelöst. Auf diese Tatsache haben schon A.G. Matoltsy und C.A. Balsamo [88] und M.S.C. Birbeck und E.H. Mercer [89] hingewiesen.

Wie die Zellmembranen werden auch die Melanine, die die Pigmentierung der Haare hervorrufen, durch Keratin lösende Agenzien nur bedingt gelöst und bleiben im Nichtproteinanteil. Die Angaben über den Melaningehalt des Haares sind in der Literatur außerordentlich spärlich und unterschiedlich. E. Schmidli [43] gibt für dunkles Haar 0.16 % an. Eine Zusammenfassung über den Stand der Melaninforschung findet man bei H.S. Mason [90]. Der Entstehungsmechanismus und die Struktur der Melanine ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Bisher ist bekannt, daß Melanine Kondensationsprodukte von kondensierten Indoldichinonen mit Proteinketten sind. Das Protein wird über eine SH-Gruppe mit dem Indolringsystem verknüpft. In den folgenden Strukturformeln sind von Mason 1967 postulierte Strukturen angegeben. Die Verknüpfung mit dem Protein ist an den mit Pfeilen markierten Stellen möglich



Mögliche Strukturen von Melanin (postuliert von H.S. Mason 1967)

Für die Entstehung der Melanine gibt Mason den folgenden Mechanismus an: Durch Sauerstoff wird in Gegenwart des Enzyms Tyrosinase Tyrosin zum 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) hydroxyliert, das anschließend zum Chinon dehydriert wird. Die Reaktion verläuft weiter über verschiedene Zwischenstufen zum 5,6-Dihydroxyindol und durch Oxydation desselben zum Indol-5,6-Chinon, das sich über ein nur spektroskopisch nachweisbares Zwischenprodukt - Melanochrom - zum Melaninringsystem zusammenlagert. Über die Art der Verknüpfung des Melanins mit dem Protein können bis jetzt keine Aussagen gemacht werden.



Mechanismus der Melaninbildung

Der Melaningehalt von Haaren, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden ist naturgemäß schwer zu bestimmen. Prinzipiell wäre eine Indolbestimmung nach Totalhydrolyse möglich, wenn die genaue Zusammensetzung des Melanins und das Ausmaß der Hydrolyseverluste bekannt oder bestimmbar wären. Eine gravimetrische Bestimmung des

Melaningehaltes durch Auswiegen des Rückstandes liefert insofern keine richtigen Ergebnisse, weil der Rückstand stets unbekannte Mengen Protein enthält. Die Angabe von Schmidli mit 0,16 % Melanin in dunklem Haar erschien uns jedoch viel zu niedrig. Bei einem Versuch, dessen Ergebnis die folgende Abbildung zeigt, wurden schwarze Haarwurzeln 12 Stunden einmal mit 15 %iger Na_2S - und zum anderen mit 15 %iger Na_2O_2 -Lösung behandelt.

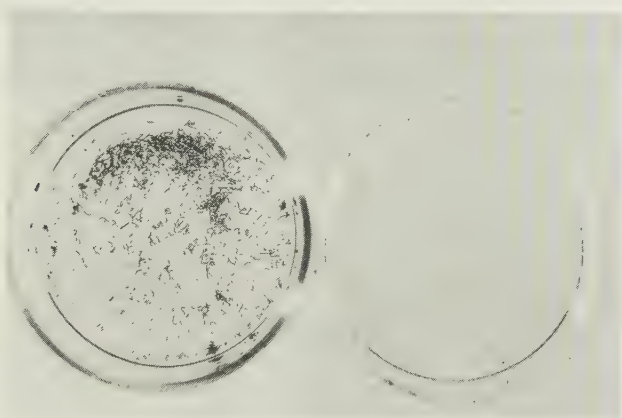


Abb.: Rückstände von schwarzen Haarwurzeln nach 12-stündiger Behandlung mit
links: 15 %iger Na_2S -Lösung
rechts: 15 %iger Na_2O_2 -Lösung

Wie man in der Abbildung erkennt, blieb nach der Behandlung mit Natriumsulfidlösung ein deutlicher, dunkel pigmentierter Rückstand, während nach der Behandlung mit Natriumperoxyd nur ein geringer Rückstand hellbrauner Partikelchen übrig blieb, was wahrscheinlich auf die schon weiter vorn erwähnte bessere Löslichkeit von Melanin in oxydierenden Agenzien zurückzuführen ist. Extrahiert man schwarze Haare mit 20 %iger Natriumsulfidlösung erschöpfend, bleibt ein unlöslicher Rückstand von etwa 10 % [44].

nicht mit einem Melaniningehalt von 0,16 % vereinbaren. Die bei der Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung eingesetzten unlöslichen Substanzen stammen nicht aus Ansätzen, bei denen erschöpfend extrahiert wurde. Die Rückstände waren daher größer als 10 %. Wir fanden im Rückstand nach der Na_2S -Behandlung von Haaren einen Nichtproteinanteil von 23 %, der fast ausschließlich dem Melanin zugeordnet werden muß, da die anderen Bestandteile in derartig geringen Konzentrationen vorkommen, daß sie zu vernachlässigen sind. Damit erhält man eine Melaninkonzentration im Haar von schätzungsweise 2 - 5 %. Diese Größenordnung ergibt sich auch, wenn man die Anfärbung einer weissen Substanz mit Ruß untersucht. Wir mischten wasserfreies Natriumsulfat mit unterschiedlichen Mengen Ruß und stellten einen Farbvergleich mit Haaren und Haarwurzeln an. Danach sollte der Melaniningehalt für dunkles Haar zwischen 2 und 7 % liegen.

VI. Untersuchung der SCMK-Proteine von Haar, Haarwurzeln und Wurzelscheiden

1. Gewinnung der SCMK-Proteine

Im Rahmen der Untersuchung des Inlösungs-gehens von Haaren, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden bei Einwirkung von verschiedenen Enthaarungsmitteln stellt sich naturgemäß auch die Frage einer näheren Charakterisierung der von uns gewonnenen Fraktionen der Haarwurzeln und der Haarwurzelscheiden. Durch die Analyse der Aminosäurezusammensetzung, die im vorhergehenden Abschnitt besprochen wurde, hatte sich gezeigt, daß es sich auch bei der von uns gewonnenen Substanz der Haarwurzelscheiden um Keratinsubstanzen handelt. In der Keratinchemie benutzt man, wie wir einleitend dargelegt haben, neben der Gewinnung löslicher Fraktionen zur näheren Charakterisierung, z.B. der oxidierten Wolle, vor allem die reduzierten Keratine, um einen näheren Aufschluß über die Zusammensetzung des Eiweißes Keratin zu erhalten. Die reduktive Spaltung des Keratins in Untereinheiten hat gegenüber der oxidativen Spaltung den Vorteil, daß bei der Reduktion schonendere Bedingungen vorliegen. Man darf also erwarten, daß die so gewonnenen Untereinheiten einheitlicher sind. Wir haben daher die Keratinsubstanzen nach den gleichen reduktiven Arbeitsmethoden modifiziert und aufgetrennt, wie dies für reduzierte Wolle beschrieben wurde. Dies hat außerdem den Vorteil, daß wir unsere Ergebnisse mit denen der Wolle vergleichen können.

Wir reduzierten die Substanzen der Faser, der Haarwurzel und der Haarwurzelscheide, die wir von schwarzen Kalbshäuten gewonnen hatten, mit 0,2 m Thioglycolatlösung bei pH 11 in Gegenwart von 8 m Harnstofflösung in 3 Stunden bei 40°C, wie dies von Crewter und Mitarbeitern [61] angegeben war. Hierbei geht ein großer Teil der Substanz in Lösung, der durch 30 Min. während des Zentrifugierens bei 40 000 g vom ungelösten Rückstand abgetrennt wurde. Die überstehende Lösung wurde mit Jodessigsäure in Gegenwart von Tris-hydroxymethylaminomethan alkyliert und der Überschuß der Jod-Essigsäure durch Zugabe von etwas Kaliumthioglykolat zerstört.

Anschließend wurde diese Lösung 12 Stunden gegen Leitungswasser, zuletzt gegen destilliertes Wasser dialysiert. Hierbei werden niedermolekulare Anteile, die vornehmlich nichtproteinärer Art oder peptidartiger Herkunft sind und aus dem Stoffwechsel der Keratinzellen stammen, abgetrennt. Die resultierende klare Lösung, die fast farblos ist, enthält S-Carboxymethylkeratine (SCMK).

Die Lösungsprodukte des SCMK wurden nun in die Fraktion A und die Fraktion B aufgetrennt. Hierzu bedient man sich der Fällungsmethode. Man gewinnt SCMKA durch Zugabe eines Essigsäure-Na-Acetat-Puffers pH 11 bei einer Ionenstärke von 0,8, bei der diese A-Fraktion ausfällt. Bei allen drei untersuchten Haarsubstanzen fiel ein weißer käsiger Niederschlag aus, der sich nach Abzentrifugieren in einer gesättigten Na-Tetraboratlösung von pH 9 bei Zimmertemperatur auflöst. Diese Arbeitsweise übernahmen wir von Crewter und Mitarbeitern[61]. Diese Autoren geben jedoch keine Erklärung dafür an, warum sich das Protein in dieser Lösung wieder auflöst. Die Auflösung nahm etwa 1/2 Std. Rühren in Anspruch. Es mußte abermals zentrifugiert werden, um gewisse ungelöste Anteile abzutrennen. Das Ausfällen und Wiederauflösen wurde dreimal wiederholt, um hierdurch die A-Fraktion zu reinigen. Die A-Fraktion stellt denjenigen Anteil dar, der

1. höher molekular ist,
2. weniger Schwefel besitzt und
3. vornehmlich aus den ursprünglich fibrillären strukturierten Anteilen des Keratins stammt.

Diese Erfahrungen sammelte man bei der Untersuchung von Wolle.

Nach der dritten Fällung wurde der Niederschlag abermals in gesättigter Na-Tetraboratlösung gelöst, gegen Leitungswasser und schließlich gegen destilliertes Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Es resultierte dabei ein schneeweißes wattiges Produkt, das sich äußerlich in keiner Weise von anderen gefriergetrockneten gereinigten Proteinen unterschied. Zur Gewinnung der SCMKB-Fraktion wurden alle Überstände, die bei der wiederholten Fällung der SCMKA-Fraktion mit Na-Acetatpuffer anfielen, vereinigt. Diese Lösung wurde 12 Stunden gegen Leitungswasser und anschließend bis zur vollständigen Entfernung der Mineralsalze gegen destilliertes Wasser dialysiert. Dieses Dialysat wurde dann gefriergetrocknet und wie das gefriergetrocknete

Produkt der Fraktion A über P_2O_5 im Exsikkator nachgetrocknet. Schließlich wurden beide Fraktionen gewogen. Die Ausbeuten, als Mittelwert aus einer Anzahl von Aufarbeitungen, für die drei Substanzen Haare, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden sowie für die daraus gewonnenen Fraktionen SCM K A und SCM K B gibt die folgende Tabelle 11 wieder:

Substanz	SCM K A	SCM K B	Verhältnis SCM K A : SCM K B
Haare	23 %	8,5 %	2.7
Haarwurzel	38 %	13,0 %	2.9
Haarwurzelscheide	25 %	5.0 %	5.0

In der Literatur wird für Wolle ein SCM K A-Anteil mit 50 - 60 % und ein SCM K B-Anteil mit 20 - 30 % angegeben. Man pflegt hierbei nur gewisse Grenzen anzugeben, weil die Zusammensetzung von Keratinsubstanzen deutlich von der Herkunft der untersuchten Wollkeratine, nämlich Rasse, Ernährung, Alter usw., abhängt. Man hat gefunden, daß auch der Anteil schwefelreicher Proteine immer dann höher wird, wenn den Tieren schwefelreiche Nahrung zugeführt wird. Derartige Untersuchungen stammen von P.J. Reiss und P.G. Schinkel [62] sowie später von J.M. Gillespie, P.J. Reiss und P.G. Schinkel [63]. Fütterungsversuche haben bei Verabfolgung schwefelreicher Proteine sowie Aminosäuren, z.B. Kasein, Methionin und Cystin einen etwa 3 - 4 % höheren Schwefelgehalt im Wollkeratin erbracht. Damit gibt es auch eine gewisse Verschiebung des Verhältnisses der Fraktionen A zu B. Die von uns gefundenen Werte unterscheiden sich deutlich von den von Y. Shechter, J.W. Landau und V.D. Newcomer [64] angegebenen Werten. Wir fanden, daß der SCM K A-Anteil bei Haaren mit etwas über 30 %, bezogen auf das gesamte SCM K, deutlich niedriger liegt als bei der von Wolle. Bei der Haarwurzel beträgt der SCM K-Anteil etwa 50 % des Gesamtkeratins, bei der Haarwurzelscheide ist er dagegen nur noch etwa halb so groß. Bildet man das Verhältnis der Fraktionen SCM K A zu SCM K B, so sieht man, daß dessen Wert mit 5 bei Haarwurzelscheiden wesentlich größer ist als bei Haaren und Haarwurzeln. Dieser hohe Wert erklärt sich, wenn wir die im vorhergehenden Abschnitt behandelten und im nachfolgenden noch einmal diskutierten Anteile der Aminosäure Cystin in den einzelnen Fraktionen betrachten. Der Cystin- bzw. Halbcystingehalt ist in den Haarwurzeln

scheidenkeratine besonders gering (auf diese Tatsache haben schon Ellis, Gillespie und Lindley [65] sowie später G.E. Rogers [36] hingewiesen). Dadurch wird naturgemäß der schwefelreiche SCM K B-Anteil sehr klein und das SCM K A zu SCM K B-Verhältnis groß.

2. Diskelektrophorese der SCM K-Proteine

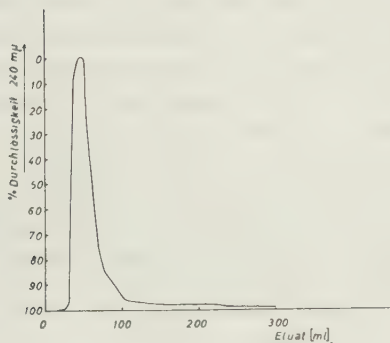
Für weitere Untersuchungen entschieden wir uns, nur noch die Fraktion SCM K A zu verwenden. Das liegt einmal daran, daß einerseits von den SCM K A-Fractionen mehr Substanz zur Verfügung stand, andererseits aber daran, daß die SCM K B-Fractionen deutlich mehr Schwierigkeiten bei der Trennung bereiteten. Dies geht aus folgenden Versuchen hervor. Die SCM K B-Fraktion wurde diskelektrophoretisch untersucht. Die nachfolgende Abbildung 28 zeigt, daß man hierbei ähnlich wie bei der später zu besprechenden SCM K A-Fraktion zwei starke Banden und anschließend eine ganze Reihe von zu meist weniger starken, aber auch wenig scharfen Banden erhält, die merkwürdigerweise alle den gleichen Abstand voneinander haben. Daß alle Banden sehr wenig scharf sind, deutet auf uneinheitliche Substanzen.

Abb. 28: Diskelektrophorese der SCMKB-Fraktion von Haarwurzel-scheiden



Wir haben von der SCMK B-Fraktion der Haarwurzelscheiden auch Trennungen an CM- und Phospho-Cellulose versucht. Hiervon legen die beiden nachfolgenden Elutionsdiagramme Zeugnis ab (Abb. 29 1, 2). In der ersten Abbildung ist das Trenndiagramm auf CM-Cellulose in Acetatpuffer von pH 4.8 angegeben. Diese Säule wurde ohne Verwendung von Harnstoff, der ja normalerweise zur Chromatographie der Keratine verwendet wird, eingesetzt. Wir haben uns jedoch auf den Standpunkt gestellt, daß in der B-Fraktion ohnehin kein strukturiertes Protein vorliegt, so daß man auch unter nicht denaturierenden Bedingungen arbeiten konnte.

Abb. 29, 1: Trennung der SCMKB-Fraktion an CM-Cellulose

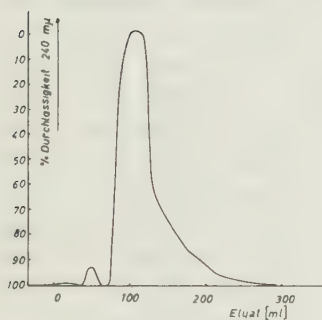


Die Bedingungen für die CM-Cellulosechromatographie stammen aus der Arbeitsgruppe unseres Institutes [67, 68], in der Kollagenbruchstücke getrennt werden. Es ist eine 15 cm lange, 3,2 cm dicke CM-Cellulosesäule, gefüllt mit Whatman-Carboxymethyl-Cellulose (CM-52 Mikrogranulär). Die Austauscherkapazität der CM-Cellulose betrug $1,0 \pm 0,1$ Milliäquivalent pro Gramm. Es wird bei 40° mit einem Ionenstärke 0.06 Na-Acetatpuffer von pH 4.8 und einem linearen Gradienten von Kochsalz, der von Ionenstärke 0.06 auf Ionenstärke 0,16 ansteigt, bei einem Gesamtpuffereinsatz von

1200 ml gearbeitet. Für jede Trennung wurden 5 - 15 mg Substanz in 5 ml Puffer auf die Säule aufgetragen. Die Substanzen wurden aufsteigend chromatographiert. Hierbei erscheint das gesamte Protein praktisch in V_0 , d.h. es wandert mit der Front. Die Wechselwirkung mit dem Füllmaterial der Säule ist offensichtlich zu gering. Eine Trennung ist auf diese Weise nicht zu erreichen. Angaben über das Molekulargewicht können somit nicht gemacht werden. Vergleicht man den Verlauf dieser Chromatographie mit Trennungen bei Kollagen an gleichen Säulen, so kann man folgern, daß die Molekulargewichte nicht sehr groß sein können. Sie sind mit Sicherheit niedriger als 20 000. Allerdings sind solche Vergleiche mit Vorsicht vorzunehmen.

Bei der Phospho-Cellulosechromatographie der SCMKB-Fraktion der Haarwurzelscheide erhielten wir ein Elutionsdiagramm, das die nächste Abbildung 29, 2 zeigt. Die Substanz läuft in einem einzigen Peak zwischen 100 - 200 ml mit einem kleinen Nachlauf, der etwa bis 260 ml kommt. Für die Phospho-Cellulosechromatographie, die nach den Bedingungen von Miller [66] durchgeführt wurde, galten folgende Versuchsbedingungen. Es wurde auf einer Säule von 80 x 17 mm Whatman-Phospho-Cellulose (Kapazität 7.4 mÄqu./g aufgelöst in Startpuffer 0,001 m N-Acetat, pH 3,7, bei 40° C), mit einem linearen Gradienten von 0-0.3 m Kochsalz bei einem Gesamtpuffervolumen von 500 ml gefahren. Zur Trennung wurden 10 - 15 mg Substanz in 5 ml Puffer auf die Säule aufgetragen und aufsteigend chromatographiert.

Abb. 29, 2: Trennung der SCMKB-Fraktion an Phospho-Cellulose



Wie erkennbar findet auch bei der Phospho-Cellulose-Trennung keine Differenzierung statt. Die Wechselwirkung mit der Säulenfüllung ist hierbei zwar ausgeprägter, denn sonst müßte das Protein bei etwa 40 ml extrahiert werden; es sind jedoch kleine Kochsalzkonzentrationen schon in der Lage, das SCMK B-Protein nahezu vollständig herunterzulösen.

Von den SCMK A-Fractionen der Haare, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden wurden dann Diskelektrophoresen durchgeführt.

Die Diskelektrophorese wurde ursprünglich von L. Ornstein [69] und B.J. Davis [70] eingeführt. Anders als bisher auf dem Kera-
tin-gebiet, wo man stets mit Stärkegelelen gearbeitet hat, arbeiteten wir mit polymerisiertem Acrylamid. Mit der Diskelektrophorese lassen sich Peptide mit einem Molekulargewicht von 5000 bis über eine Million trennen. Diese Methode ist vergleichbar mit der Dünnschichtchromatographie in der präparativen organischen Chemie. Sie dient demnach als analytische Methode zum Nachweis der Einheitlichkeit. Abgesehen von ganz wenigen Fällen,

hat sich nämlich stets eine Substanz, die nur eine einzige Bande in der Diskelektrophorese ergab, als einheitlich erwiesen.

Durch eine Polymerisation von Acrylamid mit dem Vernetzungsreagenz N,N'-Methylenbisacrylamid lassen sich in kleinen, auf beiden Seiten offenen Röhrchen Gele herstellen. Durch Dosierung des Vernetzungsreagenzes gelingt es, Gele verschiedener Porengröße herzustellen. Die Gelelektrophorese hat gegenüber der Papierelektrophorese insofern einen großen Vorteil, daß man dabei ein Trägermaterial hat, das eine Absorption aufweist. Auch der Effekt der Elektroosmose tritt hierbei nicht auf. Einerseits ist die genannte Porengröße des Gels für die Trennleistung entscheidend, zum anderen die Lösung der betreffenden Substanz. Man kann ferner durch Wahl geeigneter Puffer und pH-Werte die Trennleistungen beeinflussen. Die disklektrophoretischen Untersuchungen wurden nach der Anleitung von Maurer [71] durchgeführt. Wir arbeiteten mit einer Gelkonzentration von 7 % und einem pH-Wert von 8.9, wobei der Elektrodenpuffer auf pH 8.3 eingestellt wurde. Bei der Präparation der Gele war es wichtig, den Gelen eine entsprechende Menge Harnstoff einzuverleiben. Die Gelierungsansätze wurden daher mit einer entsprechenden Menge Harnstoff versetzt, so daß die Konzentration nachher 8 m betrug.

Bei der diskontinuierlichen Elektrophorese hat sich ferner das Arbeiten mit 2 übereinander befindlichen Gelen bewährt. Über das eigentliche Trenngel wird noch ein locker polymerisiertes Gel, das sogen. Spacer-Gel polymerisiert. Dieses dient dazu, daß die Substanzen sich an der Trennzone Spacer-Gel und Trenn-Gel zu einer scharfen Front formieren. Das Spacer-Gel ist ein viel weitmaschigeres, weniger vernetztes Gel.

Nach der Elektrophorese werden die Gelkörper aus dem Röhrchen herausgelöst und mit 1 %iger Aminoschwarzlösung angefärbt. Der überschüssige Farbstoff wird anschließend innerhalb von 24 Std. mit 7 %iger Essigsäure herausgelöst.

Die folgende Abbildung 30 (1,2) gibt nun die diskelektrophoretischen Bandenmuster der Harnstoffextrakte der verschiedenen Fraktionen der zunächst noch nicht reduzierten Eiweiße wieder.

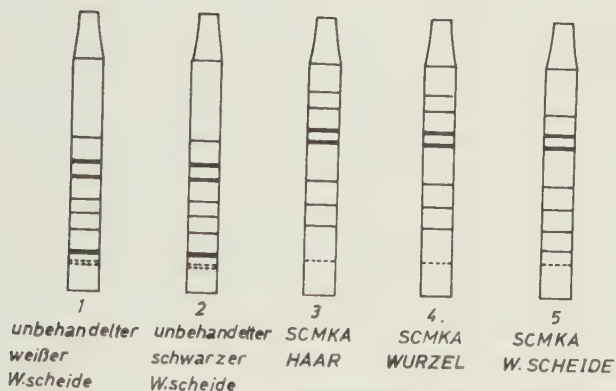


Abb. 30

Es ist leicht verständlich, daß sich eine Diskelektrophorese nur an gelösten Proteinen durchführen läßt. Andererseits ist es bekannt, daß auch ohne Reduktion oder Oxydation ein gewisser Anteil der Keratinprodukte in Harnstoff löslich ist. So wurden, um auftragbare Substanzmengen für die Diskelektrophorese zu erhalten, Haarwurzelscheiden 4 Min. in 8 m Harnstofflösung bei 50° geschwenkt und scharf abzentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde aufgetragen (siehe Abb. 30, 1,2).

Man erkennt aus der Abbildung 30 (3,4,5) die außerordentliche Ähnlichkeit der Diagramme von SCMKA von Haaren, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden. Diese Ähnlichkeit ist dadurch charakterisiert, daß man in der Mitte 2 starke Banden hat. Oberhalb dieser beiden starken Banden hat man im Falle der Haare und der Haarwurzel 2

schwache Banden, unterhalb hat man 3 starke Banden. Außerdem gibt es eine ganz scharfe dünne Markierung an der Stelle, wo sich quasi die Front befindet. Diese dünne Bande, die in den Abbildungen durch gestrichelte Linien dargestellt ist, wird durch Harnstoff allein hervorgerufen, wie auch Blindversuche gezeigt haben.

Die Diagramme der weißen und schwarzen Haarwurzelscheiden [Abb. 30 (1,2)] zeigen prinzipiell auch die beiden starken Banden, darüber aber jeweils nur eine schwache Bande, wodurch sie sich von den Diagrammen der Haare und der Haarwurzeln unterscheiden. Sie unterscheiden sich aber auch dadurch, daß sie unterhalb der beiden starken Banden eine zusätzliche Bande zu den 3 Banden aufweisen. Diese weitere Bande läuft sehr schnell, befindet sich also ganz dicht an der Harnstofffront. Vergleicht man SCMKA von Wurzelscheide (Abb. 30, 5) mit Harnstoffextrakten der Wurzelscheide [Abb. 30 (1,2)], so erkennt man auch hier ein sehr ähnliches Bild, wenngleich die Lauftiefe hier etwas geringer ist als bei der SCMKA-Fraktion der Wurzelscheide. Wir haben ebenfalls oberhalb der beiden kontrastreichen Banden nur eine Bande und unterhalb insgesamt 4 Banden. Nur in diesem Falle ist die am weitesten laufende, die offenbar niedermolekularste Substanz, weniger intensiv als bei den reinen Harnstoffextrakten. Diese Feststellung der außerordentlichen Ähnlichkeit der diskelektrophoretischen Muster von Haaren und Haarwurzeln auf der einen Seite und Haarwurzelscheiden auf der anderen Seite ist bemerkenswert. Sie wurde in dieser Eindeutigkeit bisher nicht festgestellt, denn die einzigen Versuche, die hierüber bereits vorliegen, stammen von Tomp-son und Donnell [72], die schlecht aufgelöste Stärkegelelektropherogramme veröffentlichten. Es ist sehr überraschend, daß auch das Untereinheitenmuster, von diesen beiden strukturmäßig an sich so verschiedenen Substanzen, der Haarwurzelscheide und der Haarwurzel, so ähnlich ist. Die Ähnlichkeit der Aminosäurezusammensetzung braucht a priori keineswegs automatisch eine Ähnlichkeit in dem Aufbau aus Untereinheiten hervorzurufen. Offenbar gibt es aber doch gewisse Zusammenhänge.

Es gilt hier folgendes kritisch zu bemerken: Bei der Extraktion von Haaren mit Harnstoff löst man in wenigen Minuten nur wenige Prozente heraus. Bei der Extraktion von Haarwurzeln ist der auflösbare Anteil deutlich größer. Bei Haarwurzelscheiden hingegen beträgt der auflösbare Anteil nach 1 Std. schon 34 % und erreicht

nach 24 Std. 44 %, wie wir quantitativ ermittelten. Diese Tatsache bedeutet, daß das elektrophoretische Bandenmuster zunächst nur eine Charakterisierung der leicht löslichen Anteile darstellt. Diese leicht löslichen Anteile sind in dem Haarwurzelscheidenmaterial prozentual deutlich stärker vertreten als in dem der Haarwurzel und in dem der Haare. Außerdem ist zu bemerken, daß die von uns gewählte Präparationsmethode freilich keineswegs ausschließen kann, daß nicht auch bei der Präparation der Haarwurzelscheiden gewisse Anteile von Wurzelanlagen und Haarzwiebeln mit in die Fraktion der Haarwurzelscheidenproteine hineingeraten. Die Tatsache jedoch, daß der Anteil an Schwefelaminosäuren in dem Haarwurzelscheidenprotein sehr gering ist, deutet darauf hin, daß wir nur relativ ungeordnete Anteile an Haarwurzelsubstanz in unserem Präparat vorliegen haben, denn sonst müßte der Anteil an schwefelhaltigen Aminosäuren größer sein. Bemerkenswert ist, daß praktisch identische Muster der SCMK A-Fraktion der Haarwurzelscheiden und der Harnstoffextrakte der Haarwurzelscheiden entstehen. Auch der in Lösung gehende Anteil der Haarwurzelscheidenproteine entspricht schon weitgehend dem, der bei der Reduktion auftritt.

Dies ist verständlich, denn das Haarwurzelscheidenkeratin enthält nur wenig Schwefelaminosäuren, die allein nach den sonstigen Erfahrungen der Keratinchemie zunächst für eine Vernetzung in Frage kommen.

Für Wolle liegen uns eingehende Untersuchungen mit der Stärkegelelektrophorese von O.P. Thompson und J.J. O'Donnell [73] vor. Diese Autoren beobachteten ebenfalls die beiden starken Banden in der Mitte des Diagramms, 3 sehr diffuse Banden unterhalb und etwas Substanz sehr verwaschener Form oberhalb der beiden starken Banden. Dies deutet darauf hin, daß offenbar auch in Wolle Bandenmuster ganz ähnlicher Verteilung auftreten wie bei Haaren, wenngleich auch hierbei kein exakter Vergleich möglich ist, da die Elektrophoresebedingungen andere waren.

3. Aminosäureanalyse des SCMKA-Anteils

Die Aminosäurezusammensetzung der unbehandelten Haare, Haarwurzeln und -wurzelscheiden ist in der folgenden Tabelle 11 den entsprechenden SCMKA A-Fractionen zugeordnet.

Tabelle 11:

Aminosäuren	Haare		Haarwurzel		Haarwurzelscheide	
	unbehand.	SCMKA	unbehand.	SCMKA	unbehand.	SCMKA
S-CM Cystein	-	9,81	-	8,27	-	2,63
Asp	5,81	7,70	6,09	6,82	8,42	8,62
Thre	5,75	4,95	6,32	4,13	4,96	4,99
Ser	9,40	8,07	9,13	8,38	8,20	6,67
Pro	7,56	4,75	6,20	3,65	5,59	4,03
Glut	9,60	15,34	11,33	14,16	13,92	14,82
Gly	9,46	7,14	8,33	11,40	9,54	8,38
Ala	6,04	5,82	5,15	5,51	7,78	7,96
Cyst	12,37	0,28	11,93	-	-	-
Val	6,02	5,69	5,53	5,24	5,38	6,09
Meth	0,35	0,34	0,33	0,32	1,12	1,27
Ileu	3,47	3,92	3,68	3,39	3,99	4,31
Leu	7,70	11,03	7,65	9,88	9,26	9,98
Tyr	3,04	2,95	3,32	5,34	2,50	2,61
Phe	2,48	2,14	2,05	2,72	3,37	3,02
Cysteinsäure	0,46	0,23	-	0,28	0,28	0,03
Lys	2,82	2,38	3,47	3,16	7,19	6,66
Hist	0,93	0,42	0,87	0,55	2,05	1,51
Arg	6,85	6,84	6,79	6,62	5,20	6,14

In der Tabelle fällt auf, daß der Cystin- oder Cysteingehalt zunächst stark herabgesetzt bzw. überhaupt kein Cystin mehr vorhanden ist. Stattdessen taucht in der Aminosäureanalyse das S-Carboxymethylcystein bei den SCMKA A-Fractionen auf. Bei der vergleichenden Durchsicht der unbehandelten Substanz mit der jeweiligen A-Fraktion fällt die außerordentliche Ähnlichkeit in der Konzentration der einzelnen Aminosäuren auf. Es gibt jedoch gewisse Abweichungen, die bei allen A-Fractionen etwa gleich sind.

So z.B. ist in der A-Fraktion jeweils der Prolingehalt deutlich erniedrigt. Der Glutaminsäuregehalt ist allgemein deutlich erhöht. Der Glycingehalt schwankt demgegenüber. Im Falle der Haare haben wir weniger Glycin gefunden, während bei Haarwurzeln deutlich mehr; bei Haarwurzelscheiden wieder etwas weniger. Schwankungen gibt es auch im Leucingehalt. Bei Haaren findet man in der A-Fraktion mehr Leucin, desgleichen bei Haarwurzeln. Bei Haarwurzelscheiden ist die Konzentration des Leucins etwa gleich. Bei Tyrosin findet man nur im Falle der Haarwurzeln deutlich mehr.

Bemerkenswert ist schließlich auch, daß man in allen Fraktionen geringe Konzentrationen an Cysteinsäure findet. Dies war zunächst überraschend. Eine Durchsicht der Literatur ergab jedoch, daß bei sehr vielen Untersuchungen der Wolle stets gewisse Mengen an Cysteinsäuren gefunden wurden.

Beim Vergleich von unbehandelten Haaren mit Haarwurzeln und mit Haarwurzelscheiden ergibt sich auch bei dieser Analysenserie eine gewisse Übereinstimmung.

Beim Vergleich der unbehandelten Substanzen erkennt man deutliche Unterschiede. So z.B. ist die Asparaginsäurekonzentration in der Haarwurzelscheide deutlich höher als in der Haarwurzel und in den unbehandelten Haaren. Der Threoningehalt ist niedriger, der Prolingehalt ist höher, besonders hoch ist der Glutaminsäuregehalt, auch der Alaningehalt ist deutlich höher und schließlich ist der Leucingehalt signifikant höher als in den Haarwurzeln und im Haar. Besonders auffällig ist jedoch der hohe Lysin- und Histidingehalt der Haarwurzelscheiden. Er beträgt mehr als das Doppelte von dem der Haarwurzeln und der Haare.

In den meisten Fällen bewegen sich die Werte zwischen 2 Extremen. Der eine Wert stammt von den Haaren, der andere von den Wurzelscheiden. Die Haarwurzeln liegen zumeist dazwischen. So kann man erkennen, daß z.B. der Asparaginsäuregehalt bei Haaren niedriger wird, dagegen in Wurzelscheiden ein hoher Wert vorliegt. Der Wert der Haarwurzel liegt dazwischen, wenn auch nahe an dem der Haare. Bei Threonin gilt diese Regel nicht. Bei Serin liegt der Wert mit 8.2 deutlich unter dem für Haare mit 9.4. Der Wert der Haarwurzel liegt dazwischen. Noch deutlicher ausgeprägt ist dieser Gang bei Prolin. In umgekehrter Richtung liegt der Gang bei Glutaminsäure vor, d.h. der Wert von 9.6 stammt von Haaren, die Glutaminsäurekonzentration

erhöht sich bei Haarwurzeln auf 11.33 und bei Wurzelscheiden auf 13.92. Die Regel stimmt wiederum nicht bei der Konzentration von Glycin und Alanin. Sie gilt wiederum bei Valin, Isoleucin und vor allem beim Lysin. Hieraus könnte man ablesen, daß die Haarwurzeln auf der einen Seite verunreinigt sind mit Haaren, auf der anderen Seite verunreinigt mit Haarwurzelscheiden, so daß die Substanz der Haarwurzel quasi eine Mischung beider darstellt. Über die Reinheit der Fraktion der Wurzelscheiden, d.h. die Nichtverunreinigung mit Wurzeln, kann hieraus nichts abgelesen werden. Die Tatsache jedoch, daß die meisten der Werte signifikant unterschiedlich sind von denen der Haarwurzel und der Haare, deutet darauf hin, daß man eine deutliche Anreicherung an einer Substanz hat, die von Wurzeln und Haaren unterschieden ist.

Bemerkenswert ist neben dem Vorkommen von viel Lysin das völlige Fehlen von Cystein und eine sehr deutliche Erhöhung der Konzentration an Methionin. Das Fehlen von Cystein hat uns bei der Aminosäureanalyse viel Schwierigkeiten bereitet. Diese Analysen wurden häufig wiederholt und nur bei einigen wenigen Analysen haben wir einen sehr kleinen Peak von Cystein erhalten. Das Fehlen von Cystein war insofern überraschend, als wir nach der Reduktion und Alkylierung immerhin 2.63 Mol/% SCM-Cystein gefunden haben. Ein genauer Vergleich mit Testsubstanzen ergab, daß auch hierbei keine Verwechslung möglich ist. Dies bestätigt sich auch durch eine wie oben schon erwähnte qualitative Aminosäureanalyse zweidimensional auf Celluloseplatten. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Papierchromatographie, wo wir Cystin zusammen mit Lanthionin analysierten. Auch hierbei war die Konzentration ebenfalls recht gering, sie war auf jeden Fall deutlich geringer als bei Haarwurzeln und Haaren. Als analytisch-methodischer Fehler wäre denkbar, daß bei der Stein und Moore-Aminosäureanalyse eine Oxidation zu Cysteinsäure stattfindet. Eine derartige Oxidation kann auch bei der Hydrolyse stattfinden. Wir haben daher auf die Vermeidung einer Oxidation erhöhten Wert gelegt, indem wir die Konzentration an Thiodiglykol erhöhten und bei der Hydrolyse sehr sorgfältig unter Stickstoff arbeiteten. Derartige Maßnahmen haben jedoch auch nicht dazu geführt, höhere Konzentrationen an Cystin zu finden.

Schließlich ist noch darauf hinzuweisen, daß wir auch bei dieser Aminosäureanalyse die schon oben mitgeteilten positiven Nachweise von Citrullin, Glucosamin und Galactosamin sowie Cystathionin führen konnten.

Von SCM B wurden keine Aminosäureanalysen durchgeführt. Man kann jedoch aus der Tabelle 11 erkennen, daß gegenüber dem Cystin und Cysteinsäuregehalt der unbehandelten Haare sowie der Haarwurzeln der SCM-Cysteingehalt sowie der Cysteinsäuregehalt deutlich herabgesetzt ist. So beträgt z.B. bei unbehandelten Haaren die Summe des Cystein- und Cysteinsäuregehaltes 12.83, der SCM-Cysteingehalt und Cysteinsäuregehalt der A-Fraktion jedoch nur 10.04M%. Das bedeutet, daß offenbar in der B-Fraktion ein höherer Anteil an Schwefelaminosäure vorliegen muß und dies ist in Übereinstimmung mit allen Beobachtungen der Literatur [74,75], nach der die B-Faktionen stets die schwefelreichen Fraktionen sein müssen. Das gilt auch für Haarwurzeln, bei denen wir bei unbehandelten Substanzen 11.93 und bei der A-Fraktion 8.55 Mol% Schwefelaminosäuren haben.

Vorversuche zur Auftrennung von SCM A-Proteinen

Die ersten Trennungen führten wir an Sephadex-Gelen durch. Die Chromatographie von Keratinproteinen ist grundsätzlich bedeutend schwieriger als die z.B. von Kollagen. Dies liegt vor allem daran, daß Keratine stets in Gegenwart von 8 m Harnstoff chromatografiert werden müssen, um eine Rekombination der α -Helixstruktur zu verhindern. In Harnstoff quellen die Cellulosen sowie vor allem die Gelkörper. Die Gelkörper werden hierbei sehr weich und zusammendrückbar sowie zerbrechlich. Es ist nicht möglich, wie bei der Chromatographie von Kollagen und anderen Proteinen die gepackten Säulen häufig hintereinander zu benutzen. Besondere Schwierigkeiten treten immer dann auf, wenn man wenig Gelkörper verwendet, wie z.B. das Biogel A 1.5 oder Sephadex G150 oder G200, sei es nun durch die Weichheit der Gelkörper verursacht oder durch die Erhöhung der Viskosität infolge der hohen Harnstoffkonzentration. Die Durchflußgeschwindigkeiten durch derartige Säulen sind deutlich herabgesetzt.

Bei der Gelchromatographie erfolgt die Trennung der Proteinuntereinheiten oder Bruchstücke aufgrund ihrer Teilchengröße und damit

aufgrund der Molekulargewichte. Hochmolekulare Substanzen treten weniger leicht in die Gelmatrix ein als niedermolekulare. Sie werden daher vorwiegend in dem zwischen dem Gelkörper befindlichen äußeren Volumen der Säule angereichert und vorzugsweise aus der Säule eluiert, d.h. sie treten zuerst am Säulenfuß auf. Man erhält eine Fraktionierung nach dem Molekulargewicht.

Wir benutzten für die Trennung eine Apparatur, wie sie die Abb. 31 darstellt.

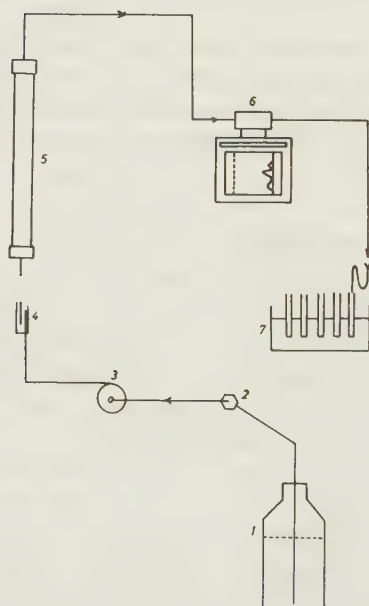


Abb. 31 Schema der Trennapparatur.

Mit Hilfe einer Pumpe (3) oder mit Hilfe von hydrostatischem Druck wird aus einem Puffergeäß (1) über ein Ventil (2) und über eine

Blasenfalle (4) der Puffer durch die Säule (5) hindurchgepumpt. Auf die Säule wurde zuvor die Substanz aufgetragen. Das Eluat am Säulenfuß oder Säulenkopf, je nachdem, ob man aufsteigend oder absteigend chromatografierte, wurde durch ein Fotometer (6) zum Fraktionssammler (7) geleitet. Als Fotometer diente uns je nach Verfügbarkeit entweder ein Beckman Gitterspektrograph Typ DB oder ein Zeiss PMQ-2-Gerät. Wir haben die Extinktion der Wellenlänge bei 276 m μ oder 254 m μ gemessen. Häufig benutzten wir auch den Uvicord I der Fa. LKB, Stockholm. Die Sephadex-Trennungen erfolgten an einer Säule mit einem Gelbett von 88,5 cm Höhe und einer lichten Weite von 32 mm. Die Molekulargewichte wurden aus dem Verhältnis von V_e/V_o bestimmt. Hierzu diente eine Eichgerade, die durch Eichung mit einzelnen bekannten Substanzen, wie z.B. Kollagenbruchstücken bekannten Molekulargewichtes, aufgestellt worden war. Es dienten uns teilweise aber auch Angaben aus den Lieferlisten für Dextran-Gele über die Verhältnisse von Schütthöhen zu den Ausschlußvolumina zur Festlegung der Ausschlußgrenzen. Derartige Angaben haben wir bei Sephadextypen oftmals bestätigen können. Die folgende Tabelle gibt die Trennbereiche der verschiedenen Gelsubstanzen der Sephadextypen an.

Tabelle 12: Trennbereiche verschiedener Sephadexgele für Peptide und globuläre Proteine nach Determann [76].

<u>Sephadextyp</u>	<u>ungefährer Trennbereich</u>
G 75	3-70000
G 100	4-150000
G 200	5-800000

Salze werden von den Gelkörpern stets sehr stark festgehalten, so daß sie erst am Ende, nachdem alle Proteine und Peptide das Gelbett verlassen haben, eluiert werden. Man benutzt die Gelkörper daher auch zur Entsalzung. Hierzu wendet man speziell diejenigen mit hohem Vernetzungsgrad, also die Typen G 15, G 25, an.

Für die obengenannten Geltypen ergeben sich folgende Gelbettvolumina und entsprechende äußere Volumina.

Tabelle 13: Ungefähre Volumina bei der Quellung von 1 g
Sephadex in Wasser nach Determann [76]

Geltyp	Gelbettvolumen (V_t in ml)	äußeres Volumen (V_o , ml)
G 75	13	5
G 100	17	6
G 200	30	9

Kann man V_o nicht rechnerisch ermitteln, so bestimmt man es mit einer sehr hochmolekularen Substanz, z.B. mit Dextranblau 2000 (Pharmacia, Uppsala) oder mit Aminopeptidase (siehe Bernhardt [77]).

Da Harrap [78,79], Gillespie [80] und Gillespie und Harrap [81] Molekulargewicht für SCMK A-Wollproteine von 60000 - 70000 angegeben haben, versuchten wir zunächst Trennungen an Sephadex G 75, weil dieses laut unserer obigen Tabelle 12 einen Trennbereich von 3-70000 besitzt.

Die Ergebnisse der Trennung von SCMK A-Proteinen der Haare, Haarwurzeln und Wurzelscheiden an Sephadex G 75 zeigen die Abb. 32 (a,b,c). Wir erkennen in ihnen, daß das Maximum des Gipfels bei etwa 175 ml liegt. Es erhebt sich die Frage, welche Molekulargewichte diese offenbar überall gleich großen Substanzen

haben können, denn ihr V_t ist gleich.

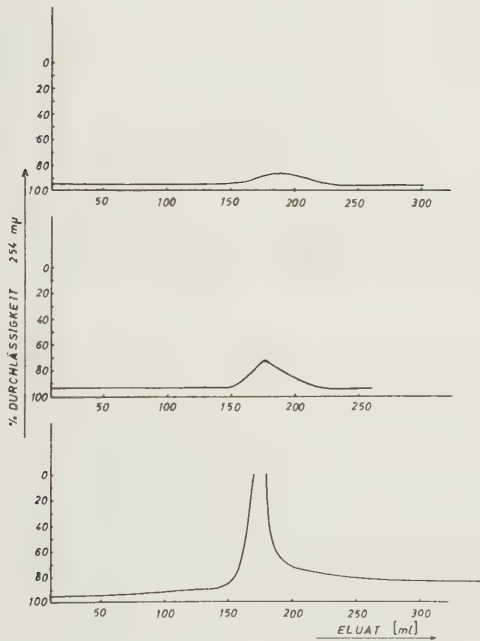


Abb. 32 Elutionsdiagramme an Sephadex G 75 .

Die Säule hat Abmessungen von 88.5 cm Länge und 3.2 cm innerer Weite und damit ein Volumen von 628 ml. Setzt man die aus der vorhergehenden Tabelle zu entnehmenden Volumina für 1 g Gelbettvolumen ein, so erhält man eine Sephadexfüllung für diese Säule von 48.3 g. Multipliziert mit den äußeren Volumen von 5 ml, ergibt das ein Totvolumen von 242 ml und damit ein Gelvolumen von 386 ml. Demnach sollte also V_0 bei 242 ml liegen. Dies ist aber

nicht der Fall.

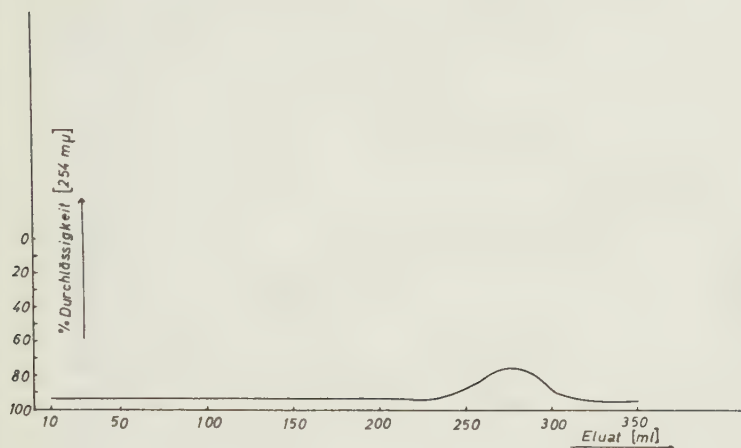
Diese Differenz liegt offenbar an einer erhöhten Quellung des Gels in 8 m Harnstofflösung. Wir bestimmten daher experimentell das Quellvolumen von 1 g Sephadex und fanden für G 75 26 ml und für G 100 30 ml. Demnach enthalten 628 ml Säulenfüllung 24.2 Sephadex G 75 bzw. 21.0 g Sephadex G 100.

In erster Näherung kann man voraussetzen, daß das Verhältnis von Gelbettvolumen zum äußeren Volumen, wie es in der vorhergehenden Tabelle 13 angegeben ist, etwa gleich ist. Danach erkennt man, daß ein Gelbettvolumen von 30 ml ein äußeres Volumen von 9 ml besitzt. Eine graphische Aufzeichnung läßt erkennen und durch Interpolation bestimmen, daß bei 26 ml Gelvolumen für 1 g Sephadex ein V_o von 8 ml resultiert. Durch Multiplikation der oben ermittelten 24.2 g Sephadex G 75 mit dem Volumen pro Gramm von 8 ml ergibt sich ein V_o von 194 ml. In analoger Weise ergibt sich für Sephadex G 100 21.0 g mit dem Faktor 9 = 189 ml.

Die Ergebnisse der Abb. 32 (a,b,c) zeigen jedoch ein Elutionsmaximum bei 175 ml. Es ist denkbar, daß die Kompressibilitätsverhältnisse der Gelkügelchen in Harnstoff größer sind als in Wasser. Die gilt besonders bei hohen Quellungsgraden, wie wir sie hier vorliegen haben. Schon eine 10 %ige Volumenminderung infolge der Kompressibilität läßt einen Faktor anstatt von 8 von 7.2 resultieren, und man erhält durch Multiplikation mit 24.2 g das tatsächlich gefundene Maximum. Offenbar ist also das SCMK A-Protein sowohl von Haarwurzelscheide als auch von Haar in V_o eluiert worden und damit ein Molekulargewicht von mindestens 70000. Es wurde daher eine analoge Trennung für das SCMK A der schwarzen Haare nochmals an G 100 durchgeführt (Abb. 33). Hierbei erhielt man einen V_e/V_o von 1.43. Es gelingt jedoch nicht, eine Beziehung zwischen dem von uns eben errechneten V_o von 189 ml mit dem V_e von 270 ml zur Berechnung eines Molekulargewichtes auszunutzen. Es fehlt nämlich an einer Eichgeraden, die für Sephadex G 100 ebenso wenig ermittelt wurde wie für Sephadex G 75. Die Erfahrung hat gezeigt, daß im Nachhinein ermittelte Eichgeraden nicht die gewünschte Genauigkeit ergeben.

Rechnet man trotzdem versuchsweise, indem man V_e/V_o von 1.43 in den Eichgeraden von Determann aufsucht, so erhält man bei Sephadex G 100 ein Molekulargewicht von etwa 60000. Dies würde im Gegensatz zu den Ergebnissen an Sephadex G 75 stehen.

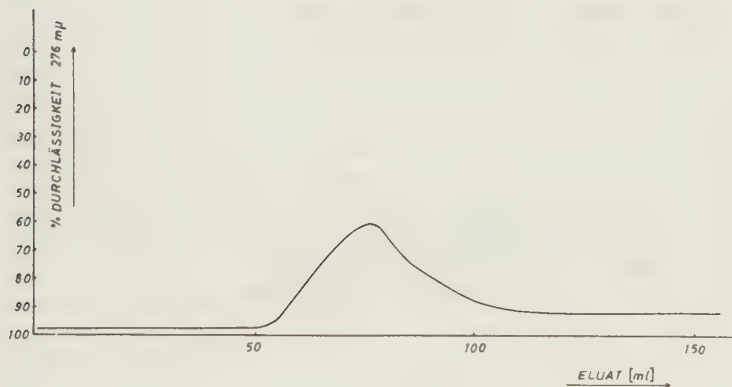
Abb. 33: Trennung von SCMKA von Haaren an Sep. G 100



Um daher verlässliche Molekulargewichte zu erhalten, haben wir eine Bestimmung an einer geeichten Agarosesäule vorgenommen. Wir verwendeten Biogel A 1.5, 200 - 400 mesh. Damit kann man Molekulargewichte von 3000 - 200000 bestimmen. Als Elutionsmittel diente uns ebenfalls 8 m Harnstofflösung, 0.05 m Tris-Puffer und eine Konzentration von 0.001 m EDTA bei einem pH-Wert von 7.4. Diese Säule mit 55 cm Packungshöhe und einem Durchmesser von 1.1 cm wurde mit den Kollagenbruchstücken $\beta_1, \alpha_1, \alpha_1$ -CB 7, α_1 -CB 3, denen die Molekulargewichte von 190000, 95000, 24000 und 14000 zukommen, geeicht. Außerdem verfahren wir nach K.A. Piez [82], der es für günstiger hält, das Totalvolumen der Säule als Bezugspunkt zu verwenden. Wir verwendeten daher tritiiertes Wasser und gewannen das V_{THO} der Säule. Die Aktivierungsmessung erfolgte in einem Flüssigkeitsscintillationsspektrometer vom Packhard-Modell 3003 Tricarb. Durch den Quotienten V_e/V_{THO} konnten wir die Eichpunkte ermitteln. V_{THO} betrug 177.8 ml. Die Eichkurve ist in Abb. 34 wiedergegeben. Die Elutionskurve von SCMKA von Haarwurzeln ist in Abb. 35 wiedergegeben. Der Gipfel dieser Kurve liegt bei einem Molekulargewicht von 95000. Dieses Molekulargewicht ist eindeutig höher als das in der Literatur für SCMKA

1 ml/h erhalten. Ein Durchpumpen ist völlig sinnlos, da hierbei das Gel sehr schnell zusammengepreßt wird.

Abb. 35: Elutionskurve von SCMKA von Haarwurzeln an Agarosegel



5. Trennung der SCMKA-Proteine an DEAE-Cellulose

Da die Vorversuche zeigten, daß sich aufgrund der Molekularsiebchromatographie keine Aufteilung in diskrete Fraktionen ergeben, versuchten wir nach Verfahrensweise von O'Donnell und E.O.P. Thompson aus dem CSIRO [83-87] zu folgen und die Keratine an DEAE-Cellulose zu trennen. Die Autoren haben in langjährigen Arbeiten die SCMKA-Proteine sowie auch die Keratine der oxidierten Wolle an DEAE-Cellulose in Gegenwart von 8 m Harnstoff aufgetrennt. Sie wendeten dabei einen pH-Wert von 7.4 an und trennten Fraktionen ab, die sie durch schrittweise Erhöhung der Kaliumchloridkonzentration, wie die Abb. 36 zeigt, erhielten.

Abb. 36: Trennung von SCMKa an DEAE-Cellulose (zitiert nach O'Donnell und Thompson)

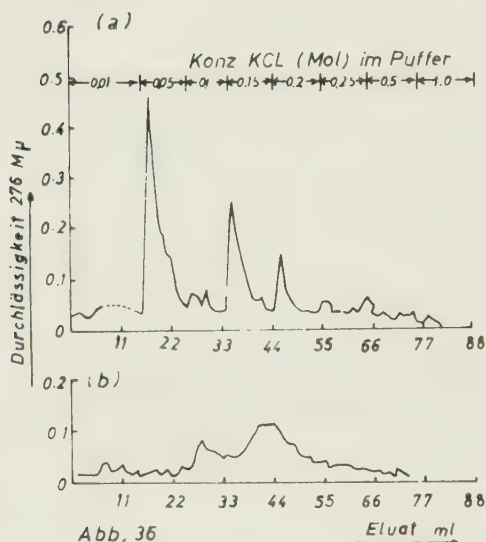
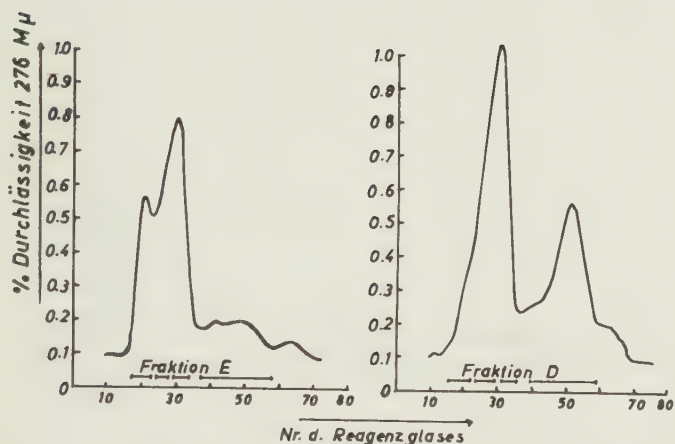


Abb. 36

- a) Elution bei schrittweiser Änderung der KCL-Konzentration
 (b) Elution bei kontinuierlicher Änderung der KCL-Konzentration

Es gelang ihnen [73,87], die beiden Fraktionen, die sich in der Diskelektrophorese als mittlere starke Banden zu erkennen geben und denen Thompson und O'Donnell die Nr. 7 und 8 bzw. Peak D und E gegeben hatten, voneinander zu trennen. Dies stellt eine beachtliche Leistung dar. Leider waren die Ausbeuten an den beiden Substanzen außerordentlich gering. Nach Abtrennung der Fraktion E und D unternahmen sie eine Geltrennung an Sephadex G 200, wovon die beiden nachfolgenden Abbildungen Zeugnis ablegen (Abb. 37).



Trennung der Fraktionen E und D an Sep.G 200

Abb. 37 (Nach Thompson und Donnell.)

Beide Fraktionen enthalten sowohl die Substanz 7 als auch die Substanz 8. Nur die Sephadextrennung der Fraktion D hat ein differenziertes Bild ergeben. Die Komponente 7 hatte sich in der Anlaufphase der Peaks D und E gesammelt, während die Fraktion 8 mehr in dem ablaufenden Bereich der Peaks angereichert ist. Derartige Fraktionen wurden gesammelt, dialysiert, gefriergetrocknet und standen nur für die Aminosäureanalyse und den tryptischen Abbau zur Verfügung.

Wir verwendeten eine Apparatur, die der für Sephadex sehr ähnlich war. Sie wurde erweitert durch ein Gradientengefäß, denn wir beabsichtigten mit Gradienten zu arbeiten. Gleichzeitig brauchten wir noch thermostatisierbare Säulen, da wir bei verschiedenen Temperaturen eluieren wollten.

Den ersten Versuch unternahmen wir mit einem Endpuffer von 0.6 m Kaliumchlorid in einer 8 m Harnstoff-, 0.01 m Tris-, 0.001 m EDTA-(Äthylendiamintetraessigsäure)-Lösung. Abb. 38 läßt zwei, wenn auch sehr flache Gipfel erkennen, der eine bei etwa 230 ml,

der zweite bei etwa 540 oder 550 ml.

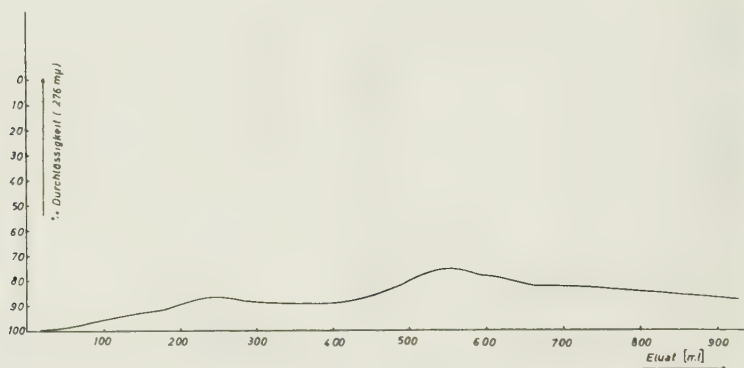
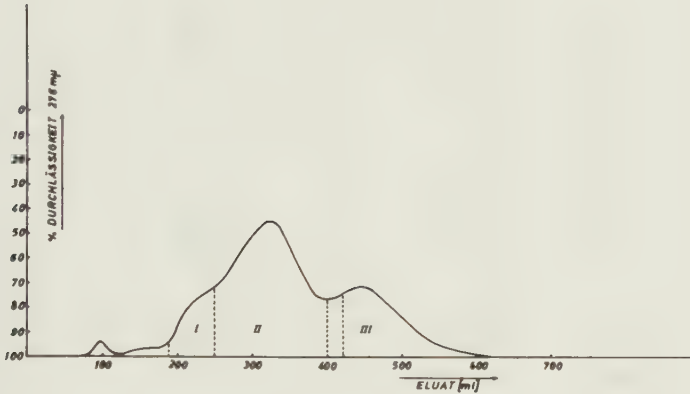


Abb. 38 Elutionskurve an DEAE- Cellulose

Eine Erhöhung der Konzentration ließ die Trennung nicht viel besser werden. Wir verwendeten deshalb in einem zweiten Versuch eine wässrige 1 m Kaliumchloridlösung als Endpuffer⁺⁾ . Die Erhöhung der Salzkonzentration im Gradienten des 2. Versuchs führt zu einer gewissen Zusammendrängung der Elutionskurve. Damit werden die Gipfel deutlich erhöht. Abb. 39 zeigt eine solche Elutionskurve. Die Trennung wird hierbei aber keineswegs besser. Man erkennt jedoch zwei Gipfel. Wir haben, da wir eine deutliche Schulter als Vorlauf des Hauptgipfels haben, hier noch eine Fraktion von 190 bis etwa 250 ml geschnitten - diese entspricht Fraktion I. Der Hauptgipfel wurde als Fraktion II bezeichnet, und der zweite Gipfel als Fraktion III.

⁺⁾ Bei beiden Versuchen arbeiteten wir bei Zimmertemperatur und mit einem Startpuffer von 8 m Harnstoff-0.01 m Tris-0.001 m EDTA. Beim ersten Versuch war der pH dieses Puffers 7.4 im zweiten 8.5.

Abb. 39: Trennung von SCMK von Wurzel an DEAE-Cellulose



Von den so gewonnenen 3 Fraktionen der SCMK-Proteine der Haarwurzeln wurden dann Diskelektrophoresen angefertigt (vgl. die dazugehörige Abb. 40). Man erkennt in der Diskelektrophorese, daß merkwürdigerweise in der Fraktion I eine einheitliche Substanz vorliegt. Es ist die am wenigsten wandernde, der zweiten Bande zugehörige Substanz. Die beiden Substanzen, die der Fraktion 7 und 8 von Thompson und Donnell entsprechen und den beiden starken diskelektrophoretischen Banden zugeordnet werden, befinden sich zusammen mit einem gewissen Anteil der Fraktion I in der Fraktion II. In der Fraktion III ist nach der Diskelektrophorese die unterste der beiden starken Banden angereichert sowie die unterste der drei schwachen Banden, die aber wenig scharf abgebildet ist. Über den Verbleib der oberen der beiden schwachen Banden sowie der ersten unteren beiden schwachen Banden ist aufgrund der bisherigen Untersuchungen mit der Diskelektrophorese nichts auszusagen.

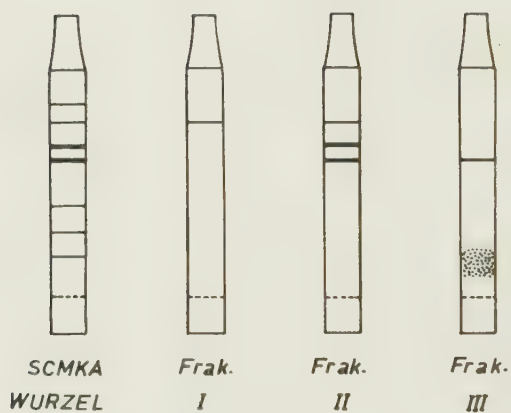


Abb. 40 Disk Elektrophorese

Von den Fraktionen II und III wurden Aminosäureanalysen gemacht, die die Tab. 14 wiedergibt (siehe s. 99).

Tab. 14

Aminosäuren	SCMKA Trennung an DEAE	
	H a a r w u r z e l	
	Fraktion II	Fraktion III
S-CM-Cystein	7.80	6.67
Asp	8,62	3,99
Thre	4,64	2,71
Ser	7,95	10,83
Pro	3,58	6,59
Glut	16,10	5,87
Gly	8,67	23,67
Ala	6,65	4,99
Cyst	0,21	0.50
Val	5.50	3,86
Met	0,42	0,11
Ileu	3.03	1,55
Leu	9,60	4,67
Tyr	3,19	10.79
Phe	2,49	2,69
Cysteinsäure	0,56	0,47
Lys	3,45	3,47
Hist	0,68	1,10
Arg	7.06	5,17

Aus der Tab. 14 erkennt man, daß die Fraktion III - die offenbar das niedrigere Molekulargewicht besitzt - einen deutlich erhöhten Anteil an Glycin und Tyrosin und einen etwas erhöhten Anteil an Serin und Prolin besitzt. Dagegen ist die Konzentration an Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin, Valin, Methionin und Isoleucin, Leucin sowie Arginin eindeutig herabgesetzt. Vergleicht man die im SCMKA von Wurzeln gewonnenen Ergebnisse mit denen von Thompson und Donnell [87], so stellt man fest, daß die Fraktionen 7 und 8 beide einen hohen Glutaminsäuregehalt besitzen. Diesen beiden Substanzen kamen die beiden starken Banden in der Diskelektrophorese zu. Sie sind im wesentlichen vergleichbar mit unserem Peak, mit der Substanz in Peak 2.

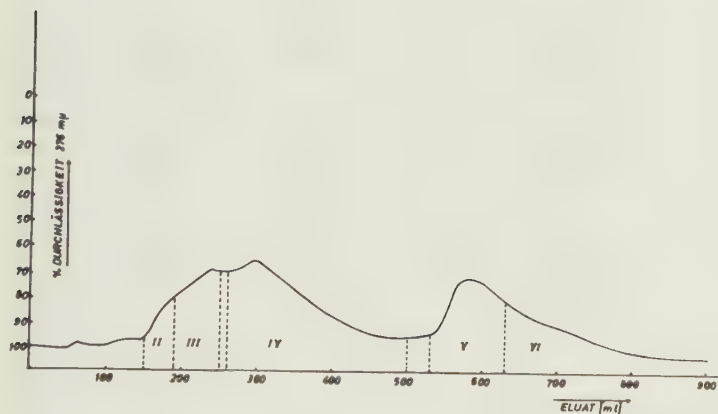
Diese Substanzen zeigen jedoch nicht den hohen Arginingehalt, der von Thompson und Donnell angegeben wurde. Bemerkenswert ist allgemein, daß die Fraktionen A - G (siehe Donnell und Thompson 73) durchweg einen sehr hohen Arginingehalt besitzen, obwohl nach der Diskelektrophorese z.B. die Fraktionen A, B und C nicht zu diesen beiden starken Banden gehören. Dies wird auch erkennbar an dem Absinken des Glutaminsäurewertes in diesen ersten Fraktionen. Stattdessen besitzen diese einen hohen Glycinwert. Auch der Tyrosinwert ist erheblich angestiegen. Diese ersten Fraktionen entsprechen wiederum der von uns isolierten dritten Fraktion und damit den schneller laufenden Diskbanden. Wir beobachteten hier - wie schon festgestellt - einen hohen Tyrosin- und Glycin-gehalt. Es ist noch eine offene Frage, ob die an Glycin und Tyrosin reichen Fraktionen wirklich zu den strukturierten Anteilen des Keratins zu rechnen sind.

Wir haben von den Fraktionen 2 und 3 die Molekulargewichte an Agarose bestimmt. Hierzu haben wir, anders als bisher, aber einen Calciumchloridpuffer (1 m CaCl_2 , 0.04 m Tris-Hydroxymethylaminomethan, pH 7.5) verwendet. Mit diesem Puffer haben wir bei der Elution von Kollagenbruchstücken sehr gute Erfahrungen gemacht. Die Säule von 84 cm x 2.5 cm wurde ebenfalls mit Kollagenbruchstücken geeicht. Bei der Elution zeigte sich jedoch, daß der Calciumchloridpuffer offenbar nicht geeignet ist, die Keratinfraktionen in unaggregiertem Zustand zu halten. Außerdem traten so starke Wechselwirkungen ein, daß das Protein nicht von der Säule herunterzulösen war, wodurch sehr niedere Molekulargewichte vorgetauscht wurden. Versuche mit harnstoffhaltigen Puffern wurden wegen der vorher beschriebenen Schwierigkeiten nicht wieder versucht, zumal die isolierten Fraktionen auch noch nicht die gewünschte Reinheit besaßen.

Es wurde vielmehr von der uns besonders interessierenden Substanz der Haarwurzelscheiden-SCMKA-Fraktion eine Trennung an DEAE-Cellulose vorgenommen. Die Bedingungen waren analog denen der SCMKA der Haarwurzel. Wir erhielten das Diagramm der Abb. 41. Auch hierbei erkennt man zwei Gipfel, der erste ist etwas größer als der zweite, aber in diesem Falle viel stärker voneinander abgesetzt. Wir fraktionierten viel häufiger. Die Fraktion II entspricht der in der vorhergehenden Abbildung genannten Frak-

tion I, die Fraktionen III und IV entsprechen der bei Haarwurzeln gewonnenen Fraktion II und die Fraktionen V und VI der Fraktion III.

Abb. 41: Trennung von SCMKA von Wurzelscheide an DEAE-Cellulose



Merkwürdigerweise fanden wir jedoch in den Fraktionen V und VI keine diskelektrophoretischen Banden mehr (Abb. 42). Die Fraktion IV faßt die schneller laufenden Banden der schwachen Bandengruppe im unteren Teil des Diskelektropherogramms sowie vor allem die beiden kontrastreichen Banden zusammen. Sie enthält offenbar die Hauptmasse des Keratins. Aber auch Fraktion II und III enthalten die obere der beiden starken Banden in gewissen Konzentrationen sowie vor allem die schwächere aus dem oberen Teil der Diskelektropherogramme. Bei Fortführung dieser Untersuchungen ist es angebracht, die Fraktion IV noch weiter zu zerlegen.

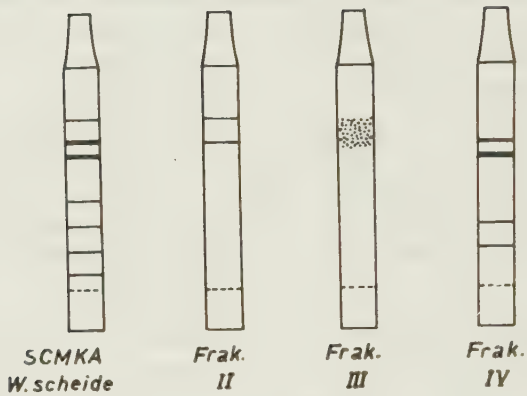


Abb. 42 Disk-elektrophorese

Von den Fraktionen IV und der im Diskelektropherogramm nicht sichtbar werdenden Fraktion V wurden Aminosäureanalysen durchgeführt, die in der folgenden Tabelle 15 wiedergegeben werden.

Aminosäuren	SCMKA Trennung an DEAE	
	Haarwurzelscheide	
	Fraktion IV	Fraktion V
S CM Cystein	0,98	-
Asp	10,14	7,97
Thre	5,70	4,42
Ser	9,03	10,35
Pro	3,74	4,50
Glut	14,21	9,35
Gly	9,10	25,75
Ala	6,98	8,65
Cyst	-	-
Val	5,59	4,25
Met	1,08	Spuren
Ileu	3,87	2,06
Leu	9,87	5,75
Tyr	2,80	0,99
Phe	3,15	2,96
Cyteinsäure	1,68	1,51
Hyls	-	-
Lys	4,81	4,82
Hist	1,64	Spuren
Arg	5,50	5,17

Tab. 15 Aminosäureanalyse der SCMKA- Fraktionen von Haarwurzelscheiden.

Man erkennt daraus, daß,entsprechend der Fraktion von SCMKA der Haarwurzeln, die in dem ersten großen Peak, also hier in Fraktion IV angereicherte Substanz einen hohen Glutaminsäure- und Asparaginsäuregehalt besitzt. Bemerkenswerterweise ist hierbei die Konzentration an SCM-Cystein sehr gering, auch die an Cysteinsäure. Völlig fehlt SCM-Cystein in der Fraktion V. Bei dieser Fraktion ist wiederum,entsprechend der vergleichbaren Fraktion aus dem SCMKA A-Protein der Haarwurzeln,der Glycingehalt sowie der Seringehalt sehr hoch. Merkwürdigerweise ist aber auch der Asparaginsäuregehalt bei den SCMKA A-Proteinen der Haarwurzel-

scheide in der Fraktion 5 höher als bei denen der Haarwurzeln. Überraschend und völlig abweichend von der Zusammensetzung der SCMK A-Proteine der Haarwurzel ist das weitgehende Fehlen von Tyrosin. Wir haben nur eine Konzentration von 0.99 Mol%, während wir bei der Haarwurzel 10.79 M% in dieser Fraktion finden. Auch der Alaningehalt ist deutlich erhöht. Man erhält so in dem Protein der Haarwurzelscheide an den typischen Aminosäuren, die im Proteinverband nicht die Bildung von α -Helices fördern, sondern vielmehr solche der β -Struktur, wie Threonin, Serin, Prolin, Glycin und Alanin allein mehr als 50 Mol%. Die vorgelegten Ergebnisse können nur ein erster Beitrag zur Lösung der Gewinnung von einheitlichen Fragmenten sein. Die Ergebnisse haben jedoch hier schon gezeigt, daß auch in der Haarwurzelscheide dieses ganz typische Vorkommen von besonders glycinreichen Fraktionen zu beobachten ist. Gleichzeitig aber gelang es nicht, das sonst stets mit vergesellschaftete Tyrosin ebenfalls in so hohen Konzentrationen nachzuweisen. Hier scheint sich offenbar ein bedeutender Unterschied zu dokumentieren.

D. Zusammenfassung und abschließende Diskussion

Das vorliegende Untersuchungsmaterial kann in zwei Abschnitte unterteilt werden, einen ersten, ausgerichtet auf die technische Anwendung und einen zweiten, der zur Gewinnung von Erkenntnissen des Keratinaufbaues beiträgt.

Der erste Teil ist entstanden aus der ursprünglichen Fragestellung, die lautete: wie kann man mit den kürzlich vorgeschlagenen oxydativen und reduktiven Enthaarungsmitteln Na_2O_2 , Peressigsäure, Chlordioxid und Natriumborhydrid sowie Natronlauge-Dimethylamin am zweckmäßigsten enthaaren? Ergänzend kann gefragt werden, ob überhaupt eine vollständige Auflösung der Bestandteile des Haares unter technischen Bedingungen möglich ist. Gelingt dies gegebenenfalls durch Kombination verschiedener Enthaarungsverfahren? Demnach mußte zunächst eine Anzahl von Reihenversuchen durchgeführt werden. Dabei werden die Bedingungen, unter denen Enthaarung stattfinden kann, systematisch variiert und die Phänomene registriert.

Diese Versuche gewannen dadurch eine besondere Bedeutung, daß erstmals die Enthaarungswirkung auch an isolierten Haarwurzeln bzw. Haarwurzelscheidensubstanzen geprüft wurde. Derartige Experimente sind bisher noch nicht unternommen worden. Diese Versuche wurden deshalb notwendig, weil gerade derjenige Anteil der Haare, der für die Verankerung der Haare in der Haut sorgt, besonders schwer aus der Haut zu entfernen ist. Die Versuche zeigten, daß prinzipiell diese Haarbestandteile leichter auflösbar sind als die vollkeratinisierten, über die Haut herausragenden Haaranteile. Besonders leicht auflösbar ist das Kerasin der Haarwurzelscheide. Die Versuche zeigten aber auch, daß bei keinem der angewandten Auflösungsmittel eine vollständige Auflösung der Haare erreicht werden kann.

Es ist notwendig, die Ergebnisse differenzierter zu interpretieren. Einerseits lassen sich natürlich die Versuche an isolierten Haarwurzelscheiden und Haarwurzeln nicht ohne weiteres auf die Bedingungen, die in den Haarfollikeln in der Haut herrschen, übertragen. Zweifellos sind die Auflösebedingungen wesentlich günstiger, wenn man mit isoliertem Material arbeitet.

Andererseits gibt es beträchtliche Unterschiede zwischen den einzelnen Enthaarungsmitteln und dies hängt offenbar damit zusammen, daß von den sehr weitgehend auflösend wirkenden Mitteln Na-Peroxid, Peressigsäure und Chlordioxid oxydative Wirkungen auch auf die prinzipiell unlöslichen Melaninanteile im Haar, Haarwurzel und Haarwurzelscheidensubstanzen ausgehen. Man erkennt diese Unterschiede besonders beim Vergleich mit dem nur reduktiv wirkenden Na-Sulfid. Bei reduktiven Behandlungen hinterbleiben zumeist stark gefärbte Substanzen, die auch die Pigmente enthalten.

Die systematische Untersuchung der Auflösbarkeit des Keratins in ihrer Abhängigkeit von Konzentration und Zeit ergab zum Teil unerwartete Ergebnisse. Es zeigte sich zunächst, daß bei allen Agenzien durchwegs etwa 40 % Enthaarungsmittel, bezogen auf Haargewicht, erforderlich sind, um eine optimale Auflösung zu erreichen, d.h. nimmt man weniger Enthaarungsmittel, so bleibt noch ein an sich auflösbarer Anteil ungelöst, nimmt aber man mehr, so bringt dieser Mehreinsatz keinen Zuwachs an Auflösung. Dieses Ergebnis besagt, daß die haarauflösende Wirkung in der Praxis vornehmlich von der Konzentration des Enthaarungsmittels in der Lösung abhängt. Es ist also anzustreben, mit so kurzen Flotten, wie sie technisch möglich sind, zu arbeiten. Nach den Ergebnissen meint man, eine völlige Gleichartigkeit der Wirkungsweise des Enthaarungsmittels zu erkennen. Das ist aber keineswegs der Fall. In der Zeitabhängigkeit der Reaktionen unterscheiden sie sich ganz deutlich. Dies erkennt man dann besonders gut, wenn man nicht die obengenannte "optimale" Konzentration von 40 % nimmt, sondern nur 25 %. Unter diesen Bedingungen zeigt Peressigsäure die beste Enthaarungswirkung, d.h. sie bewirkt schon in 3 Stunden oder sogar noch schneller die höchste Auflösung des Haarkeratins. Merkwürdigerweise ergibt eine Verlängerung der Einwirkungszeit eine signifikante Abnahme des löslichen Anteils.

Na-Sulfid zeigt bei 25 % einen ganz steilen Anstieg zwischen 3 und 5 Std. Einwirkungszeit bis zu einem Maximum, das allerdings unter dem von Peressigsäure liegt. Natriumperoxid benötigt dagegen mehr Zeit zum Auflösen. Die Auflösungswirkung steigert sich mit der Zeit stetig und übertrefft nach ca. 2 Tagen deutlich die Wirkung von Na-Sulfid.

Zur Interpretation schlagen wir folgende Erklärung vor:

Na-Sulfid und Na-Peroxid wirken beide (das eine reduktiv, das andere oxydativ) keratolytisch auf die S-S-Brücken. Die Alkalität ist jedoch bei Na-Peroxid höher. So kommt zu der genannten S-S-Auflösung noch eine Peptidgruppenhydrolyse hinzu. Diese benötigt Zeit. Im Übrigen scheint die alkalische Oxydation im Gegensatz zur sauren aber generell langsamer zu verlaufen.

Die Hemmung der Auflösung mit zunehmender Reaktionszeit bei Einwirkung von Peressigsäure ist durch das Zusammenwirken zweier gegenläufiger Wirkungen der Peressigsäure zu erklären: Sie wirkt einerseits oxydierend und spaltend auf die S-S-Brücken und bei sehr langer Reaktionszeit vermutlich ähnlich peptidgruppenauflösend wie das aus Na-Chlorit entstehende ClO_2 [6]. Ganz sicher ist jedoch, daß Peressigsäure andererseits schon nach relativ kurzer Zeit beginnt, Brücken zu bilden und Vernetzungen hervorzurufen. Der Mechanismus ist noch unklar. Beim Kollagen ist die Stelle, an der die Brücke entsteht, kürzlich von C. Iancu [91] lokalisiert worden.

Mit diesen Ergebnissen stehen die Untersuchungen des Lanthioningehaltes in Zusammenhang. Wir vermuteten zunächst bei Einwirkung von Peressigsäure eine starke Lanthioninbildung als Erklärung für die Auflösungshemmung. Dies ist aber nicht der Fall. Die Lanthioninbildung ist bei der Einwirkung von Natriumsulfid am stärksten.

Schließlich sind noch einige Bemerkungen zu den Kombinationen von Enthaarungsmitteln zu machen. Es wurden verschiedene Enthaarungsmittel nacheinander zur Einwirkung gebracht und der jeweilige Anteil, der in Lösung ging, vor Einsatz des zweiten Enthaarungsmittels abgetrennt. Eine Addition der Wirkung ist nur bedingt zu bemerken. Man sollte sonst eine vollständige Auflösung des Keratins beobachten, da die Konzentration der Einzelmengen der Enthaarungsmittel sich auf 50 % addierte. Weiter oben hatten wir jedoch gesehen, daß eine Steigerung über 40 % keine Erhöhung der Auflösewirkung herbeiführt. Wir hofften bei diesen Versuchen, daß der Rückstand von 5 - 20 %, den man gewöhnlich bei Einzeleinwirkung der Enthaarungsmittel erhält, durch eine derartige Kombination verringert wird. Dies

ist jedoch (in Versuch, Abb. 7) nur zum Teil eingetreten. Nach fünfstündiger Einwirkung wurde der Rückstand durch die Kombination von Na_2S -Vor- und Na_2O_2 -Nachbehandlung nicht geringer, als bei Na_2O_2 in 50 %iger Konzentration allein. Im Gegenteil war der Rückstand sogar ein wenig größer. Bei der Kombination aus Na-Sulfid-Vor- und Peressigsäure-Nachbehandlung sowie bei den Kombinationen $\text{PES}/\text{Na}_2\text{O}_2$ und $\text{Na}_2\text{O}_2/\text{PES}$ findet eine deutliche Verminderung des Rückstandes - verglichen mit dem, bei der Behandlung mit den Einzelkomponenten in 50 %iger Konzentration, zurückbleibenden statt.

Während man sich von den zuletzt aufgeführten Kombinationen eine technische Verbesserung der Auflösung versprechen kann, führen die Kombinationen $\text{Na}_2\text{O}_2/\text{Na}_2\text{S}$ und $\text{PES}/\text{Na}_2\text{S}$ zu verminderter Löslichkeit. Auffällig ist, daß bei beiden Kombinationen Na_2S an zweiter Stelle eingesetzt ist. Offenbar ist ein großer Teil der Aktivität von PES und Na_2O_2 zur S-S-Brückenspaltung verbraucht worden, so daß Melaninoxydation und -abbau nicht mehr stattfinden kann. Bei umgekehrter Reihenfolge besorgte die S-S-Spaltung das Reduktionsmittel Na_2S .

Ein technisch aktuelles Problem ist die Beseitigung schwarzer Haarrückstände. Man kann vermuten, daß sich schwarze Haare, Haarwurzeln und Wurzelscheiden schlechter auflösen als weiße. Unsere Versuche mit schwarzen und weißen Substanzen zeigten, daß dies nur bedingt zutrifft. Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden von schwarzen Haaren lösen sich generell etwas schlechter als die von weißen, wenn man mit Natriumsulfid, Natriumperoxid und Natronlauge/Dimethylamin arbeitet. Der Unterschied ist zwar eindeutig, aber nicht so groß, daß man von einer signifikanten Schwerlöslichkeit der schwarzen Haare sprechen kann. Im übrigen sind merkwürdigerweise die Substanzen der schwarzen Haare bei der Behandlung mit Peressigsäure eindeutig besser löslich.

Von den Aminosäureanalysen von Haaren, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden sowie von den bei den verschiedenen Enthaarungen aufgelösten Substanzen und Rückständen erwarteten wir einen tieferen Einblick in die Wirksamkeit der verschiedenen Enthaarungsmittel.

Die aus den Aminosäureanalysen abgeleiteten Erkenntnisse sind in mehrfacher Hinsicht sehr interessant.

Zunächst ist eine Charakterisierung der Ausgangssubstanzen, der Haare, Haarwurzeln und Haarwurzelscheidenproteine möglich geworden. Dabei konnte man, wie zu erwarten, die Identität der Aminosäurezusammensetzung der Haarwurzelkeratine und der Haarkeratine feststellen. Aber auch die Haarwurzelscheidenproteine sind denen der Haarwurzeln und denen der Haare in Bezug auf die Aminosäureanalysen bemerkenswert ähnlich. Ausgenommen sind die Haarwurzelscheidenproteine, die kein oder nur sehr wenig Cystin und Spuren von Cysteinsäure enthalten. (Wir haben eine größere Anzahl von Wiederholungsanalysen von verschiedenen Gewinnungschargen der Haarwurzelscheiden gemacht, dennoch können wir nicht mit Sicherheit behaupten, daß gegebenenfalls nicht doch kleine Mengen Cystein, vielleicht um 1 % in dem Haarwurzelscheidenprotein enthalten sind.) Einige weiter unten zu erörternde Tatsachen im Zusammenhang mit der Ähnlichkeit in der Aminosäurezusammensetzung zwischen Haarwurzelscheiden- und Haarwurzelproteinen sind für uns ein Beweis, daß es sich trotz des Fehlens von Cystein im Haarwurzelscheidenprotein um ein Keratin handelt. Hierbei stört auch nicht die Tatsache, daß die Aminosäure Lysin und in gewissem Umfang auch Histidin mit einer unübersehbar höheren Konzentration am Aufbau der Haarwurzelscheidenproteine beteiligt sind als bei Haaren und Haarwurzeln. Der beträchtlich erhöhte Lysingehalt scheint demnach für das Haarwurzelscheidenkeratin ebenso charakteristisch zu sein wie der Mangel an Cystein. So gravierend die Unterschiede der unbehandelten Proteine sind, so wenig ausgeprägt und wenig charakteristisch sind die Unterschiede in den löslichen Anteilen bzw. unlöslichen Anteilen dieser Proteine nach verschiedenen keratolytischen Behandlungen. Es ist offenbar gleichgültig, ob oxydativ oder reduktiv, sauer oder alkalisch behandelt wird, daß jeweils immer ein ähnlicher Anteil der Proteine zunächst bevorzugt in Lösung geht und ein entsprechend untereinander ähnlicher Anteil in den ungelösten Rückständen verbleibt. Soweit Vergleichsmöglichkeiten bestehen, kann gesagt werden, daß in dem unlöslichen Anteil nach Peressigsäure-, Na_2S - oder Dimethylaminbehandlung stets der Gehalt von Glutaminsäure, Prolin und Lysin deutlich herabgesetzt war. Dies gilt besonders für die Haarwurzelscheiden.

In dem unlöslichen Anteil findet man entsprechend angereichert die Aminosäuren Serin, Prolin und Glutaminsäure. Für die Herabsetzung des Lysingehaltes im löslichen Anteil konnten wir kein Pendant im Unlöslichen ermitteln, da die Veränderung des Lysingehaltes nur an Wurzelscheiden beobachtet wurde. Von diesen konnten keine ungelösten Anteile untersucht werden, weil zu wenig Rückstand blieb.

Bei der Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung und bei der Einzelbestimmung war schließlich noch die Anwesenheit von Citrullin, Cystathionin, Ornithin, Glucosamin und Galactosamin sowie gewisser kleiner Anteile von Hexosen und schließlich von mehr als 10 % Lipiden in dem Material der Haarwurzelscheide festgestellt worden. Diese Feststellungen zeigen die Heterogenität der Substanz.

Eine Charakterisierung des wesentlichsten Anteils der Keratine der Haarwurzeln und der Haarwurzelscheiden kann nur gelingen, nachdem eine Aufarbeitung und Reinigung stattgefunden hat. Hiermit befaßt sich nun der zweite Teil der Arbeit.

Zunächst ist festzustellen, daß sich von der Haarwurzelscheide nahezu 50 Gew.% in Harnstofflösung schon ohne Reduktion auflösen. Damit unterscheiden sich diese Keratinsubstanzen ganz wesentlich von denen der Haarwurzeln und Haare. Zur Reinigung wurden jedoch die Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden als SCMKA- und B-Fractionen aufgearbeitet, was ebenfalls in Harnstofflösung erfolgte. Die Behandlung bestand aus Reduktion, Alkylierung und mehrfachem Umfällen (Auflösen in Natriumboratpuffer pH 9 und Ausfällen in Acetatpuffer pH 11). Anschließend wurde dialysiert. Durch diese Reinigung wurde ein großer Teil der Begleitsubstanzen beseitigt.

Das Ziel jeder Reinigung ist die Gewinnung einheitlicher Substanzen. Die Diskelektrophorese ließ aber 6 verschiedene Individuen erkennen. Wir prüften dabei die Auftrennung durch Gradientenelution auf DEAE-Cellulosesäulen, nachdem sich gezeigt hatte, daß sich durch Gelchromatographie keine einheitlichen Fraktionen aus dem SCMKA abtrennen ließen. Nach Variation des pH-Wertes und des KCl-Gradienten wurden folgende Bedingungen als vorläufig optimal angenommen: Startpuffer:

8 m Harnstoff, 0.01 n Tris-Hydroxymethylaminomethan, 0.001 n EDTA, pH 8.5, Endpuffer: 1 m KCl in Wasser, 500/500 ml, 12 ml/ Stunde, 20° C.

Es gelang eine Auftrennung in zwei deutlich voneinander abgesetzten Peaks. Diese enthielten jedoch keineswegs molekulareinheitliche Fraktionen. In dieser Situation wäre an sich eine Rechromatographie angebracht, die jedoch wegen Substanzmangel unterlassen werden mußte, denn hierfür wären abermals optimale Gradientenbedingungen durch systematische Versuche zu ermitteln gewesen. Dafür wurde aber eine Charakterisierung der aus der ersten Trennung herausgeschnittenen Fraktionen versucht. Die Molekulargewichtsbestimmung schlug fehl, da sich die Fraktionen nicht in Calciumchloridpuffer lösten, der zur Molekularsiebchromatographie auf Agarose am geeignetsten ist. Die Aminosäureanalyse von Fraktionen ergaben aber bei Haarwurzeln und Wurzelscheiden und deren SCMKA-Fraktionen überzeugende Unterschiede und Anreicherungen.

Zunächst soll jedoch das Ergebnis der Diskelektrophorese besprochen werden. Es war oben schon erwähnt worden, daß die Haarwurzelscheidensubstanz zu 50 % in Harnstoff in Lösung geht. Diese Substanz zeigt ein völlig identisches Diskbandenmuster mit dem der SCMKA der Wurzelscheide. Die SCMKA erfaßt dabei zweifellos einen etwas größeren Anteil der Scheidensubstanz, weil die Reduktion die Löslichkeit etwas erhöht. Die Identität der Bandenmuster besagt, daß, abgesehen von dem unlöslich gebliebenen Anteil, das Protein SCMKA bei der Reinigung in allen seinen Individuen erhalten bleibt. Bei der Fraktionierung an DEAE-Cellulose wurde eine Fraktion erhalten, die neben einer Bande nur eine geringe Verunreinigung enthält. Eine weitere Fraktion zeigte ebenfalls die gleiche Bande - und nur diese - aber sehr viel verwaschener. Diese Bande gehört der Gruppe von zwei starken Banden im Diskelektrophoresechromatogramm aller Keratine an, die auch schon von Thompson und Donnell festgestellt wurden₁[87]. Die Fraktionierung von SCMKA der Haarwurzelscheidensubstanz an DEAE-Cellulose ergab unter dem zweiten Peak merkwürdigerweise eine Substanz, die keine Banden in der Diskelektrophorese erkennen ließ.

Diese Trennversuche wurden alle ebenfalls an SCMKA von Haarwurzeln durchgeführt. Hierbei konnte nur eine Fraktion (I) isoliert werden, die eine einzige Disk-Bande ergab. Die Fraktion III hatte neben einer starken Bande noch eine diffuse Schwärzung nahe der Front. Dies war die Substanz im 2. Peak. Die Diskbandenmuster zeigten bei allen Haarkeratinen eine große Ähnlichkeit. Sie haben zwei starke Banden im Mittelfeld, eine schwächere schneller laufende und zwei schwächere langsamer laufende. Bei SCMKA der Haarwurzelscheidensubstanz fehlt eine langsamer laufende Bande, dafür taucht aber eine neue schneller laufende Bande nahe der Front auf. Abstand und relative Intensität der Banden sind aber sonst völlig gleich.

Die Aminosäurezusammensetzung der SCMKA von Haaren, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden wurden mit den Aminosäureanalysen der betreffenden unbehandelten Ausgangssubstanzen verglichen. Bei diesem Vergleich erkennt man die Reinigungswirkung, die durch die Abtrennung der Matrixproteine SCMKB und der unlöslichen Anteile entsteht. Es nimmt der Gehalt an Glutaminsäure und Asparaginsäure in SCMKA durchwegs zu, desgleichen bei SCMKA der Haarwurzel in Glycin, Leucin, Tyrosin und Phenylalanin. Durch die Fraktionierung an DEAE-Cellulose wurden von SCMKA von Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden, jeweils von 2 Fraktionen, genügend Substanz für mehrere Aminosäureanalysen erhalten. Bei Wurzelscheide existiert demnach eine Fraktion, die gegenüber der SCMKA-Ausgangssubstanz eine außerordentlich starke Anreicherung von Glycin bis auf 26 Mol% (von 8.4 % ausgehend) besitzt. Diese Fraktion zeigt - und das ist bemerkenswert - kaum Tyrosin und nur 4.5 % Prolin. Es kann also kein Kollagen sein. Es kann auch nicht die bei Haaren bekannte glycin- und tyrosinreiche Fraktion sein. Desgleichen ist die Serinkonzentration von 6 auf 10 % erhöht und der Glutaminsäuregehalt von 15 auf 9 % gesunken. Auch der Leucin- und Isoleucingehalt ist deutlich herabgesetzt. Die andere Fraktion zeigte entsprechend eine Anreicherung von Glutaminsäure und Asparaginsäure und eine Verringerung des Prolingehaltes. Während die zuvor besprochene Substanz offenbar aus nichthelikalen Bereichen stammt, ist letztere helikaler Herkunft.

Bei einer Fraktion der SCMKA-Substanz der Haarwurzeln taucht neben Glycin auch Tyrosin in deutlich erhöhter Proportion auf. Diese Fraktion ist offenbar eine Parallele zu der zuerst besprochenen der Haarwurzelscheide. Der Prolingehalt ist deutlich

erhöht, der Gehalt an Leucin, Isoleucin, Asparaginsäure und Glutaminsäure dagegen herabgesetzt. In der anderen SCMK-A-Fraktion von Haarwurzeln sind die letztgenannten Aminosäuren alle ausgeprägter vertreten, so daß man auch hier annehmen kann, daß der zuerst besprochene Anteil dem nichthelikalen und der zweite Anteil dem helikalen Bereich zuzuordnen ist.

E. Experimenteller Teil

In diesem Teil geben wir die genauen Versuchsvorschriften an, nach denen wir unsere im Hauptteil beschriebenen Versuche durchgeführt haben, soweit sie nicht dort bereits ausführlich beschrieben worden sind. Um eine möglichst gute Übersicht zu erreichen, wurde dieser Abschnitt in Unterabschnitte eingeteilt, die soweit wie möglich, den Abschnitten des Hauptteils entsprechen.

I. Gewinnung der Ausgangssubstanzen

Wie im Hauptteil beschrieben, haben wir die Keratin-Proteine von Kalbshaaren, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden untersucht. Zuerst ging es also darum, diese Substanzen rein zu präparieren. Dazu haben wir frisch abgezogene, ungesalzene und auch nicht anderweitig konservierte, schwarzbunte Kalbshäute von 6...7 kg Gewicht zunächst in fließendem Wasser von 16° C gut gewaschen und danach entfleischt. Die Häute wurden so in ca. 20 x 20 cm große Stücke geteilt, daß die Stücke entweder die schwarzen oder die weißen Haare enthielten. Das Fell dieser Stücke wurde zunächst mit einer Haarschneidemaschine auf eine Länge von 2 - 3 mm geschoren. Die dabei angefallenen Haare wurden gut mit Wasser gewaschen, im Trockenschrank bei 80° C 4 Tage und im Exsikkator über Phosphorpentoxid 48 h getrocknet und so für die folgenden Versuche verwendet.

Die geschorenen Fellstücke wurden mit einer Mischung aus 1 Teil Methylmethacrylat (Plexigum 354 der Fa. Röhm & Haas) und 1 Teil Starter (Pleximon 804 der Fa. Röhm & Haas) möglichst gleichmäßig ca. 0,5 cm dick auf der Fellseite begossen und im Abzug polymerisieren lassen. Die bei der Polymerisation freiwerdende Wärme wurde dabei durch die über die Stücke streichende, vom Abzug angesaugte Luft ausreichend abgeführt. Unter diesen Bedingungen ist der Kunststoff nach ca. 0,5 h auspolymerisiert und die Haut kann von den durchsichtigen Plexiglasplatten abgezogen werden. Dazu faßt man mit einer Hand die Haut und der anderen Hand die Plexiglasplatte und zieht die Haut in Richtung des Haarstriches von der Plexiglasplatte ab. Dabei werden die Haarwurzeln und die sie umhüllenden Haarwurzelscheiden aus der Haut herausgerissen und stehen wie ein kurzes Fell auf der Plexiglasplatte. Hier ist anzumerken, daß die

Epidermis auf der Plexiglasplatte haftet, wenn das Fell zu kurz geschoren worden ist, während sie sonst auf der Haut bleibt und von dort durch Abziehen mit einer Pinzette gewonnen werden kann. Über die einzelnen Handgriffe informiert man sich am besten in der Abb. 15 im Hauptteil.

Die Haarwurzelscheiden wurden gut angefeuchtet, durch Bürsten mit einer Kunststoffbürste von den Haarwurzeln abgetrennt und mit destilliertem Wasser in eine Schale gespült. Die nassen Haarwurzelscheiden wurden anschließend zweimal durch ein Sieb mit 0,25 mm Porenweite gesiebt, danach gefriergetrocknet und im Exsikkator über Phosphorpentoxid aufbewahrt. Die Ausbeute pro Quadratmeter Fell betrug ca. 1,5 g Haarwurzelscheiden.

Zur Gewinnung der Haarwurzeln wurden die Plexiglasplatten nach dem Abbürsten der Haarwurzelscheiden mit einem elektrischen Rasierapparat rasiert und die Haarwurzeln im Exsikkator über Phosphorpentoxid aufbewahrt. Die Ausbeute pro Quadratmeter Fell betrug 5 - 10 g Haarwurzeln.

II. Auflösungsversuche mit Haaren, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden

1. Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Reaktion

Diese Untersuchungen wurden ausschließlich an schwarzen Kalbshaaren durchgeführt.

1.1. Auflösen

Als Enthaarungsmittel wurden käufliches

- a) Na_2S (66%ig), schuppenförmig, BASF Ludwigshafen
- b) Na_2O_2 , gepulvert, E. Merck, Darmstadt
- c) PES (30%ig), Degussa, Frankfurt. (Der Gehalt an freier

PES wurde durch Titration mit Thiosulfat bestimmt) verwendet.

Es wurden jeweils genau 1 g Haare in einen 50 ml Schliffervolumen eingewogen und mit 10 ml dest. Wasser und 250 mg Enthaarungsmittel versetzt, der Erlenmeyer verschlossen und bei Raumtemperatur verschieden lange Zeiten (nämlich 3/5/10/20 Std. und bei Na_2O_2 und PES auch 45 Std.) über-Kopf-geschüttelt.

1.2. Rückstandsbestimmung

Nach Beendigung der Reaktionen wurde das Reaktionsgemisch in Zentrifugengläser umgefüllt und bei 14.000 g 30 Minuten zentrifugiert. Die PES-behandelten Proben wurden vorher mit 10 %iger NaOH mit Hilfe einer Glaselektrode genau auf pH 12,5 eingestellt.

Die überstehende, noch trübe Lösung und der Niederschlag, nachdem er in 50 ml destilliertem Wasser aufgenommen wurde, wurden über gewogene Fritten G-2 abgesaugt und solange gewaschen, bis das Waschwasser neutral war. Die Fritten wurden 24 Std. im Trockenschrank bei 100°C und 48 h im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet und der unlösliche Anteil ausgewogen.

1.3. Bestimmung des löslichen Anteils

Zur Bestimmung des löslichen Anteils wurden Filtrat und Waschwasser vereinigt und zuerst 10 h gegen fließendes Leitungswasser und danach 10 h gegen destilliertes Wasser, das alle 3 Stunden gewechselt wurde, zur Entfernung der Mineralsalze dialysiert. Das Dialysat wurde in gewogene 250 ml Rundkolben gefüllt und nach Gefriertrocknen und 48stündigem Trocknen im Exsikkator über P_2O_5 ausgewogen.

Der Gesamtfehler betrug bei diesen Versuchen bezogen auf die Haareinwaage $\approx 5\%$.

2. Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Reaktion bei Kombination von zwei verschiedenen Enthaarungsmitteln

Auch diese Versuche wurden ausschließlich an schwarzen Kalbshaaren durchgeführt. Als Enthaarungsmittel wurden die im vorherigen Kapitel aufgeführten Substanzen verwendet, und zwar in den Kombinationen:

1.) Na_2S - 2.) Na_2O_2

1.) Na_2O_2 - 2.) PES

1.) Na_2S - 2.) PES

1.) PES - 2.) Na_2S

1.) Na_2O_2 - 2.) PES

1.) PES - 2.) Na_2O_2

2.1. Auflösen

Jeweils 1 g Haare wurden genau in einen 50 ml Schliffenmeyer eingewogen und mit 10 ml destilliertem Wasser und 250mg des jeweiligen 1. Enthaarungsmittels versetzt. Die Weiterbehandlung geschieht nach 1.1.

2.2. Rückstandsbestimmung

Dieser Arbeitsgang ist von Stufe 1.2. dadurch unterschieden, daß die Niederschläge auf der Fritte nicht getrocknet und gewogen, sondern vollständig in das Reaktionsgefäß zurückgebracht und wieder mit 10 ml destilliertem Wasser und jetzt 250 mg des jeweiligen 2. Enthaarungsmittels versetzt und verschieden lange Zeiten bei Raumtemperatur über-Kopf-geschüttelt wurden. Die Bestimmung des Ungelösten wurde analog Arbeitsgang 1.2. vorgenommen und der gelöste Anteil durch Ergänzen auf 100 % ermittelt. Die Bestimmung des löslichen Anteils analog 1.3. konnte nicht vorgenommen werden.

3. Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Reaktion

Die Versuche wurden jeweils wie bei den vorhergehenden Versuchen an 1 g Haaren mit 250 mg Enthaarungschemikalien in einem Flüssigkeitsvolumen von 10 ml in 50 ml Schliffkolben unter Schütteln durchgeführt. Die Versuche wurden nebeneinander einmal an schwarzen und ein ander Mal an weißen Haaren vorgenommen. Neben den bisher verwendeten Enthaarungsmitteln wurden zusätzlich noch Dimethylaminsulfat (LAB) von der Fa. Merck, Natriumborhydrid, NaBH_4 rein, bezogen von der Degussa oder von der Metallgesellschaft Frankfurt, und ClO_2 verwendet; ClO_2 , entsteht beim Ansäuern v Natriumchlorit, NaClO_2 liegt als 30 %ige Natriumchloritlauge unter dem Namen Imprapell CO von den Farbwerken Hoechst vor. Das Ansäuern erfolgte mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 3.5. In der folgenden Tabelle betrug in der Spalte Natronlauge die Konzentration an Dimethylaminsulfat 10 % und die an Natriumsulfat wasserfrei 20 %. In der darunter befindlichen Spalte betrug die Konzentration von Dimethylaminsulfat 10 % und die von Natriumsulfat 40 %. In der folgenden Tabelle ist auch die Konzentration, die in der Spalte ClO_2 angegeben wurde, eine Konzentrationsangabe der eingesetzten Chloritlauge. Desgleichen beziehen sich die Angaben der Peressigsäurekonzentration auf eine 30 %ige Peressigsäure, wie sie von der Fa. Degussa zur Verfügung

gestellt wurde. Wenn die Konzentration der Peressigsäure, die vorher durch Titration ermittelt wurde, nicht mehr 30 %ig war, so wurde sie entsprechend höher dosiert in dem Maße, wie auf 30 %ig umgerechnet wurde.

Enthaarungsmittel	Konzentration in % (bezogen auf Haareinwaage)
Na_2S	10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80
Na_2O_2	15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50
PES	10, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170
ClO_2	40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110
NaOH	10, 30, 50, 60
NaOH	10, 30, 50, 60

Die Ansätze wurden genau 5 Std. über Kopf in kleinen Erlenmeyern geschüttelt und die löslichen Anteile nach 1,3 sowie die unlöslichen nach 1,2 bestimmt.

III. Bestimmung von Einzelkomponenten in Haaren, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden

1. Bestimmung von Lanthionin und Cystin nach der Methode von Dowling und Crewter

Haare, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden, sowie die löslichen und die unlöslichen Fraktionen dieser Substanzen, wurden im Exsikkator über Phosphorpentoxid bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und anschließend hydrolysiert. Die Hydrolyse erfolgte unter Stickstoff in einem verschlossenen Kölbchen mit 6 n Salzsäure über Nacht bei 100° C im Trockenschrank. Das Hydrolysat wurde zur Trockne eingedampft und wiederholt zur Vertreibung der Salzsäure in Wasser aufgenommen und erneut abgedampft. Die Papierchromatographie erfolgte auf Whatman 3 MM-Bogen der Größe 60 x 40. Die Laufrichtung entsprach ^{der} Kante von 40 cm. An der längeren Kante von 60 cm wurde ein Streifen von ca. 5 cm umgebogen und 4 cm von dieser "Bruchkante" wurden die Substanzen streifenartig in der Reihenfolge

- 1.) Referenzsubstanz (Lanthionin-Cystin),
- 2.) zu untersuchende Probe,
- 3.) Referenzsubstanz,

- 4.) zu untersuchende Probe,
- 5.) Eichsubstanz verschiedener Konzentration,
- 6.) zu untersuchende Probe,
- 7.) Referenzsubstanz aufgetragen.

Das Chromatogramm wurde 24 Stunden in Phenol; Eisessig, Äthanol und Wasser im Verhältnis 150:10: 40:40 absteigend entwickelt. Nach der Entwicklung wurde der Bogen über Nacht im Abzug abgedampft, die Streifen mit den Referenzsubstanzen numeriert und ausgeschnitten und anschließend mit Ninhydrin angefärbt. Mit Hilfe dieser Streifen wurden die deutlich voneinander abgesetzten Flecken des am wenigsten wandernden Lanthionin und des etwas schneller laufenden Cystin sowie der hiervon deutlich abgesetzten noch schneller laufenden anderen Aminosäuren nach dem Wiederaussetzen des Bogens auf die nicht angefärbten Bereiche des Chromatogramms übertragen. Danach wurden die markierten Stellen in Form von 10 cm langen und 2 cm breiten Streifen aus dem Chromatogramm herausgeschnitten. Diese Streifen wurden auf der einen Seite spitz zugeschnitten, auf der anderen Seite wurde ein Streifen dicken Chromatographiepapiers angehängt, der in eine Petrischale mit 0,1 M Na-Formiatlösung, die mit Salzsäure auf pH 4,2 eingestellt war, eintauchte und über den Rand der Petrischale herunterhing. Dadurch wurde der Streifen systematisch eluiert. Etwa 1 ml Eluat mit dem darin befindlichen Lanthionin bzw. Cystin wurde in einem graduierten Zentrifugenglas aufgefangen. Die Eluatmenge reichte aus, um die auf dem Papier befindlichen Substanzen vollständig zu eluieren, wie es eine Prüfung der getrockneten Streifen durch Anfärbung mit Ninhydrin ergab. Dem Eluat wurden erst 1 ml Eisessig und anschließend 1 ml frisch bereitete Ninhydrinreagenz (0,625 g Ninhydrin + 10 ml 6 M Phosphorsäure + 15 ml Eisessig) zugesetzt. Dann wurde 10 Minuten im kochenden Wasser erhitzt, mit destilliertem Wasser auf 4 ml aufgefüllt und nach 15minütigem Stehen, währenddessen sich die Lösung abkühlte, wurde im ELCO-Fotometer (Zeiss) bei 450 nm kolorimetriert. Gleichermassen waren die auf dem Papier mitgelaufenen Eichsubstanzen gemessen worden, die zur Aufstellung einer Eichgeraden verwendet wurden. Es erwies sich als vorteilhaft, 10 mg Protein zu hydrolysieren, das Hydrolysat bis auf 0,25 ml einzuengen und davon ungefähr 0,05 ml pro 3 cm aufzutragen.

2. Bestimmung von Zucker nach der Anthronmethode

Von den, wie oben besprochen, getrockneten Proben wurden Einwaagen für die Hydrolyse vorgenommen, die in 6 n Salzsäure 5 Std. bei 105° unter Stickstoff durchgeführt wurde. Das Hydrolysat wurde eingedampft und der Rückstand in 1.2 ml Wasser aufgenommen. Von dieser Lösung nimmt man 1 ml und überschichtet in einem schwer schmelzbaren Reagenzglas mit 5 ml eisgekühlter Anthronreagenzlösung (bestehend aus 200 mg Anthron in 100 ml 75 %iger Schwefelsäure). Man kühlt 5 Minuten mit Eiswasser, schüttelt dann gut durch und kühlt das Gemisch, das sich beim Umschütteln erwärmt hat, erneut ab. Danach wird die Probe 5 Minuten in siedendem Wasser erhitzt und anschließend mit Eiswasser gekühlt. Nach einer 1/2 Std. wird die Extinktion bei 625 nm sowie bei 700 nm gegen einen gleichbehandelten Blindwert gemessen.

3. Glucosaminbestimmung

Zu 1 ml der Testlösung (die man, wie oben beschrieben, durch Hydrolyse der Proteine mit 6 n Salzsäure gewinnt) in einem graduierten 10 ml Reagenzglas werden 1 ml Acetylacetonreagenz (siehe unten) hinzugefügt und das Gemisch gut geschüttelt. (Ist die zu untersuchende Lösung sauer, so wird die Probe vor der Zugabe des Acetylacetonreagens mit 1 Tropfen Phenolphthalein und 1 n Natronlauge bis zum Auftreten der ersten Rotfärbung und anschließend vorsichtig mit soviel 0,3 n Salzsäure versetzt, bis die Rotfärbung gerade wieder verschwindet). Anschliessend füllt man mit dest. Wasser auf 3 ml auf (dabei werden gleichzeitig die Wände abgespült). Die Gläser werden dann mit einem durchbohrten Gummistopfen, der mit einem kleinen Steigrohr versehen ist, verschlossen und 20 Min. im kochenden Wasserbad erhitzt. Dann wird mit kaltem Wasser auf Zimmertemperatur abgekühlt und dem Gemisch 5 ml Äthanol zugesetzt. Alsdann gibt man 1 ml Ehrlich-Reagenz zu, füllt mit Äthanol auf 10 ml auf und schüttelt gut um. Die Gläser werden dann nochmals 10 Min. bei 65 - 70° im Wasserbad erwärmt, danach auf Raumtemperatur abgekühlt, umgeschüttelt und bei 530 nm im ELCO gegen gleichbehandelte Blindproben gemessen.

Die Herstellung des Acetyl-Aceton-Reagenzes

1 ml frisch destilliertes Acetyl-Aceton (Kp. 138 - 140° C) wird in 50 ml 0,5 n Sodalösung gelöst. Das Reagenz muß vor jeder Messung neu angesetzt werden, da es bei 18° C nur 2 - 3 Stunden haltbar ist.

Herstellung des Ehrlich-Reagenz

Das Ehrlich-Reagenz (p-Dimethylaminobenzaldehyd) wird folgendermaßen frisch bereitet: Der stets etwas gelbliche Aldehyd wird in einer Menge von 12.5 g in 70 ml verdünnter Salzsäure (1 Teil konz. Salzsäure, Dichte 1.19 + 6 Teile Wasser) unter leichtem Erwärmen gelöst. Dann wird mit 35 ml Wasser verdünnt, wieder erwärmt, vom geschmolzenen Anteil abdekantiert und die Lösung langsam erkalten gelassen. Der Niederschlag wird abfiltriert und im Vakuum über P_2O_5 getrocknet. Man erhält eine Substanz vom Schmelzpunkt $71 - 72^{\circ} C$. Die Substanz ist leicht gelblich. Der filtrierten Lösung wird langsam unter Rühren 20 %ige Natronlauge zugesetzt, bis der Aldehyd ausfällt. Er wird abfiltriert, in Wasser aufgeschlämmt, dann abgenutscht und im Vakuum über P_2O_5 getrocknet. Man erhält so ein weißes Produkt. 0.8 g des Aldehyds der 2. Charge werden in 30 ml abs. Äthanol gelöst und 30 ml konz. Salzsäure von der Dichte 1.18 zugesetzt. Die Lösung ist bei $-10^{\circ} C$ einige Tage haltbar.

Herstellen der Vergleichslösungen

50 mg Glucosaminhydrochlorid werden in Wasser gelöst und auf 50 ml aufgefüllt. Von dieser Lösung werden 5 ml (entspricht 5 mg Glucosamin) mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt. 1 ml dieser Lösung enthält somit 0,1 mg Glucosamin. 0,1 ml, 0,4 ml, 0,7 ml sowie 1 ml der Lösung wurden zur Aufstellung der Eichgeraden verwendet.

4. Lipidbestimmung

Ungefähr 100 mg Haarwurzeln wurden über Nacht in 2 ml Wasser geweicht, danach mit Hilfe eines Starmix bei 15.000 U homogenisiert. Das Homogenisat wurde über Nacht in 2 ml Chloroform-Methanol (2:1) bei Zimmertemperatur extrahiert. Anschließend wurde zentrifugiert und der Extrakt mittels einer Spritze aus dem Zentrifugenglas abgezogen und mit luftfreiem dest. Wasser geschüttelt. Nach der Trennung der Phasen wurde die obere wässrige Phase so weit wie möglich abgezogen und der Rest durch dreimaliges Zusetzen einer Mischung aus Chloroform/Methanol/Wasser (3:48:47) entfernt. Der Lipidextrakt wurde über Nacht im Vakuum über P_2O_5 , Calciumchlorid und Paraffinschnitzeln getrocknet.

IV. Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung

1. Hydrolyse

Zur Hydrolyse wurden 1 - 5 mg des jeweiligen Proteins in einem 25 ml Spitzkolben unter Stickstoff 24 Std. mit 6 n Salzsäure bei 110° hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde 3-4 mal zur Entfernung der Salzsäure bis zur Trockne eingeeengt, nachdem jeweils etwas Wasser zugesetzt war. Hierbei wurde der überwiegende Anteil der Salzsäure vertrieben. Für die Bestimmung der quantitativen Aminosäurezusammensetzung auf dem Beckman-Unichrom wurde die Probe zuletzt in 0.2 n Natriumcitratpuffer pH 3.2 gelöst. Für die qualitative Bestimmung wurde der Rückstand in Wasser aufgenommen.

2. Dünnschichtchromatographische Trennung der Aminosäuren

2 ml des wie oben behandelten Hydrolysats werden jeweils 1,5 cm vom unteren und 1,5 cm vom linken Rand auf 10 x 10 cm Dünnschicht-celluloseplatten ohne Fluoreszenzindikator der Fa. E. Merck, Darmstadt, punktförmig aufgetragen. Die Entwicklung erfolgt in zwei Dimensionen, wobei jede Dimension zweimal entwickelt wird. Dieses Verfahren ist in jüngster Zeit bei der Fa. E. Merck, Darmstadt, entwickelt worden und hat sich als sehr leistungsfähig erwiesen. Die Entwicklung erfolgt in der ersten Dimension in einem alkalischen Laufmittel der Zusammensetzung Pyridin : Dioxan : Ammoniaklösung (mindestens 25 %ig) : Wasser = 35 : 35 : 15 : 15, in der zweiten Dimension in einem sauren Laufmittel der Zusammensetzung n-Butanol : Aceton : Essigsäure (99 %ig) : Wasser = 14 : 14 : 3 : 9. Die Laufhöhe beträgt in jeder Dimension 8.5 cm; ein Lauf dauert ca. 2 - 3 Stunden.

Nach dem Entwickeln im Elutionsmittel 1 wird jeweils 2 Minuten im Trockenschrank bei 80° C zwischengetrocknet, nach dem Entwickeln im Elutionsmittel 2 kann wahlweise mit dem Föhn oder im Trockenschrank zwischengetrocknet werden. Zum Nachweis der Aminosäuren wurden die gründlich getrockneten Platten mit Ninhydrinreagenz besprüht und 15 Min. im Trockenschrank bei 120° C erhitzt. Danach konnten die einzelnen Aminosäuren identifiziert werden.

3. Ausführung der quantitativen Aminosäureanalyse

Die quantitative Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung erfolgte mit dem Beckman-Unichrom-Aminosäureanalysator. Dies ist ein auto-

matisches Gerät, mit dem wir z.Zt. nach dem Zweisäulenverfahren gearbeitet haben. Die lange Säule (50 cm x 0.9 cm) war mit dem Beckman-Harz M 73, die kurze Säule (10.5 cm x 0.9 cm) war mit dem Beckman-Harz TA 35 gepackt. Die lange Säule diente zur Bestimmung der neutralen und sauren Aminosäuren, die kurze zur Bestimmung der basischen. Die Eichung des Gerätes erfolgte mit der Beckman-Aminosäure-Standardmischung, der noch Oxyprolin und Oxylysin zugefügt war. Zusätzlich wurden von uns als Testgemisch eine extra Standard-Mischung aus Citrullin, Cystathionin, Glucosamin, Galactosamin und Ornithin sowie SCM-Cystein verwendet. Die zur Eichung erforderlichen Aminosäuren stammten von: S-Carboxymethyl- α -Cystein von Mann Research Laboratories, L-Hydroxylysin reinst von Schuchardt, München, α -L-Cystein, L-Ornithin, L-Citrullin, D-Galactosamin und D-Glucosamin von der Fa. Serva, Heidelberg. Diesem Testgemisch waren einerseits einzelne Aminosäuren der Standardmischung, andererseits aber die gesamte Standardmischung (aber ohne Hydroxylysin und Hydroxyprolin) zugegeben worden, um die Orientierung in dem Elutionsdiagramm zu erleichtern. Die aufgetragene Menge der Standardamino-säuren betrug 0.5 μ Mol/Aminosäure. Die Auswertung der Diagramme erfolgte graphisch nach der Höhe x Breite-Methode, wie das auch in der Anleitung beschrieben ist. Die Harze wurden nach jedem Lauf mit 0.1 n Natronlauge regeneriert und anschließend mit Startpuffer pH 3.2 equilibriert. Eichläufe mit der Aminosäuretestmischung wurden spätestens nach jeder 4. Aminosäure-Analyse vorgenommen. Es wurden die für die Untersuchung des Kollagens üblichen Bedingungen eingehalten. Diese lauten:

Für die lange Säule: 160 Min. Elution mit Startpuffer pH 3,21, danach 140 Min. Elution mit dem zweiten Puffer pH 4.25. Man eluiert 110 Min. bei 30° C und erhöht die Temperatur für die restliche Zeit auf 55° C.

Für die kleine Säule: 100 Min. Elution mit Puffer pH 5,28 bei 55°. Es wird eine 60 m lange Ninhydrinfarmentwicklungsscoil verwendet.

V. Gewinnung der SCMKA-Proteine

860 mg Haarwurzelscheiden, Haarwurzel- bzw. Haarsubstanz wurden bei 40° C 3 Std. in Gegenwart von 30 ml einer Lösung, die 8 m an Harnstoff und 0.2 m an Natriumthioglykolat war und mit Natronlauge auf einen pH-Wert 11 eingestellt war, behandelt. Diese Arbeitsweise entspricht weitgehend der von Crewter und Mitarbeitern [61] angegebenen.

Die Harnstofflöslichkeit wurde völlig analog untersucht, allerdings enthielt die Lösung kein Natriumthioglykolat und wurde nicht auf pH 11 eingestellt.

Nach der Inkubationszeit wurde auf einer WKF-Kühlzentrifuge bei 40000 g innerhalb von 30 Min. vom ungelösten Rückstand abgetrennt und anschließend dekantiert. Die überstehende Lösung wurde durch Zufügen von 0,8 g Jodessigsäure und 1,6 g Tris-Hydroxymethylaminomethan zu je 10 ml der Lösung alkyliert. Man läßt die Lösung unter gelegentlichem Umschwenken 30 Min. bei Zimmertemperatur stehen und entfernt anschließend den Überschuß von Jodessigsäure durch Hinzufügen von 0,6 g Kaliumthioglykolat pro 10 ml Lösung. Diese Lösung wurde zuerst 12 Stunden gegen Leitungswasser und danach noch einmal 12 Stunden gegen dest. Wasser dialysiert. Das Dialysat wurde dann gefriergetrocknet. (Sofern es sich um ein größeres Volumen handelte, wurde die Lösung vor dem Gefrier-trocknen bei maximal 40° C teilweise eingeengt). Das resultierende Produkt ist eine weisse, voluminöse Substanz.

VI. Ausführung der Diskelektrophorese

Die Diskelektrophorese wurde nach der Beschreibung von Maurer [71] durchgeführt. Wir benutzten das Gerät Acrylophor der Fa. Pleuger, Belgien. Zur Trennung wurden Polyacrylamidgele bestimmten Vernetzungsgrades und bestimmter Pufferkonzentration dadurch hergestellt, daß man die Röhrchen mit den nachfolgenden Stammlösungen füllte.

Stammlösungen:

- 1.) 48 ml 1 n HCl + 36,3 g Tris-Hydroxymethylaminomethan + 0,23 ml N,N',N',-Tetramethyldiamin (TEMED) + H₂O (auf 100 ml auffüllen, einstellen auf pH 8,9).
- 2.) 28 g Acrylamid + 0,735 g N,N',-Methylenbisacrylamid (BIS) + H₂O (auf 100 ml auffüllen).
- 3.) 0,14 g Persulfat mit H₂O auf 100 ml auffüllen.
- 4.) 48 ml 1 n HCl + 5,98 Tris-Hydroxymethylaminomethan + 0,46 ml TEMED + H₂O auf 100 ml auffüllen, pH 6,7.

Die Lösungen 1, 2, Wasser und 3 mischt man im Verhältnis 1:2:2:4. Anschließend macht man diese Lösung durch Zusatz von festem Harn-

stoff 8 m an Harnstoff. Man füllt die Trennröhrchen zu 2/3 ihrer Höhe und überschichtet die Lösung vorsichtig mit etwas Wasser, um eine vollkommen glatte Oberfläche zu erzielen. Nach ca. 30 Minuten ist das Trenngel polymerisiert und das zum Überschichten benutzte Wasser kann abgegossen werden. Anschließend bereitet man aus einem Gemisch der Stammlösungen 4, 5, 6 und 7 im Verhältnis 1:2:1:4 abermals eine Lösung, die man wiederum mit festem Harnstoff so lange versetzt, bis die Lösung 8 m ist und die man in einer Dicke von 1 cm auf das Trenngel aufgibt. Nach etwa 30 Min., während dieser Zeit wird mit UV-Licht bestrahlt, erstarrt diese Lösung zu dem sogenannten Spacergel. Auch diese Lösung kann man mit etwas Wasser überschichten, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Das Wasser wird nach der Polymerisation abgegossen.

Stammlösungen:

5.) 10 g Acrylamid + 2.5 g Bis + H_2O auf 100 ml auffüllen.

6.) 4 mg Riboflavin + Wasser auf 100 ml auffüllen.

7.) 40 g Saccharose + Wasser auf 100 ml auffüllen.

Zur Trennung benutzt man einen Elektrodenpuffer, bestehend aus 6 g Tris-Hydroxymethylaminomethan + 28.8 g Glycin + H_2O (auf 1 l auffüllen, einstellen auf pH 8,3). Zum Gebrauch wird diese Lösung auf das Zehnfache verdünnt.

Nach der Polymerisation werden die fertigen Röhrchen in die Kammer eingesetzt, der Elektrodenpuffer in die untere Elektrodenkammer und auch in die obere Kammer etwa 1 cm hoch eingefüllt. Danach werden die Substanzen in Form ihrer Lösung mit einer kleinen Injektionsspritze und einer feinen Kanüle in Mengen von 100 - 150 μ l, entsprechend 1mg Substanz pro 1 Milli liter (gelöst in 8 m Harnstoff-Tris-Puffer pH 8,4) vorsichtig auf das Spacer-Gel aufgetragen. Dabei muß man darauf achten, daß es keine Vermischung mit dem Elektrodenpuffer gibt. Anschließend wird 1 Std. mit 5 mAmp./Röhrchen elektrophoretisch entwickelt. Die Kathode weist dabei nach oben, die Anode nach unten. Die Stromstärke muß während der Elektrophorese öfter nachgeregelt werden. Nach der Trennung werden die Gele mit Hilfe einer feinen Kanüle und einer normalen Rekord-Insulinspritze durch vorsichtiges Spritzen von Wasser zwischen Gel und Röhrchenwand herausgelöst

und in einer 1 %igen Amidoschwarzlösung (Amidoschwarz extra B, Serva. Heidelberg) in 1 %iger Essigsäure 15 Min. angefärbt. Anschließend wurden die proteinfreien Zonen durch 24-stündiges Baden in 7 %iger Essigsäure wieder entfärbt.

VII. Trennung der SCM-K A-Proteine an DEAE-Cellulose

Die Trennung an DEAE-Cellulose erfolgte säulenchromatographisch mit einer Apparatur, die der im Hauptteil beschriebenen, für die Gelchromatographie verwendeten, entspricht.

Wir verwendeten eine thermostatisierbare Plexiglassäule von 3,2 cm innerer Weite, die 15 cm hoch mit DEAE-Cellulose Whatman DE 52 gefüllt war. Die DEAE-Cellulose (gekauft bei der Fa.W.u.R.Balston, England) wurde in 8 m Harnstofflösung, die 0.01 m an Tris-hydroxymethylaminomethan und 0.001 m an EDTA war und auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt war, suspendiert. Nach 24 Stunden wurde die überstehende Lösung abdekantiert, um die feinen Teilchen zu entfernen. Es wurde noch dreimal frische Pufferlösung aufgegeben, absetzen gelassen und der Überstand dekantiert. Anschließend wurde die Cellulose in einer Saugflasche 2 Stunden im Wasserstrahlvakuum entgast. Danach wurde die Cellulose blasenfrei in die Säule gefüllt und mit Startpuffer stabil gepumpt.

Die Zusammensetzung der verschiedenen Startpuffer, die sich von dem eben genannten unterscheiden, sowie die der Endpuffer wird in der folgenden Tabelle angeführt. Die Tabelle enthält außerdem die Bedingungen der einzelnen Trennversuche an DEAE-Cellulose.

Die Puffer bestanden durchweg aus einer Lösung, die 8 m an Harnstoff, 0.01 an Tris-hydroxymethylaminomethan und 0.001 m an EDTA waren. Der pH der Puffer variierte. Die Durchflußgeschwindigkeit des Elutionspuffers durch die Säule betrug bei allen Versuchen 12 ml/h.

Versuchs- Nummer	aufgetragene Menge in mg/ml	Puffer-pH	Kalium- chlorid- gradient in Molari- tät	Tempe- ratur	Volumen von Start- u. End- puffer (in ml)
1	15-50/10-20	8.5	0 - 1 m in Waaser	20	500/500
2	15-50/10-20	8.5	0 - 1 m in Wasser	20	500/500
3	15-50/10-20	7.4	0 - 1 m in Wasser	25	600/611
4	15-50/10-20	8.7	0 - 0.6 in Harnstoff	30	500/500
5	15-50/10-20	7.4	0 - 0.6 in Harnstoff	20	600/600

F. Kurzzusammenfassung

1. Schwarze und weiße Kalbshaare wurden mit verschiedenen Enthaarungsmitteln behandelt und die Abhängigkeit der Löslichkeit von der Art des Enthaarungsmittels, von der Zeitdauer der Einwirkung und von der Konzentration bei Anwendung einzelner und kombinierter Enthaarungsmittel bestimmt.

Dabei wurde gezeigt, daß oxidative Enthaarungsmittel Haare besser lösen als reduktive, daß eine optimale Auflösung im allgemeinen innerhalb von 3 - 5 Stunden erreicht wird und daß die Löslichkeit erwartungsgemäß mit steigender Konzentration zunimmt.

2. Es wurde eine Methode entwickelt, um Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden rein zu isolieren. Diese Substanzen wurden genauso wie Haare mit verschiedenen Enthaarungsmitteln behandelt und die Abhängigkeit der Löslichkeit von der Art des Enthaarungsmittels bestimmt.

Es wird gezeigt, daß die Löslichkeit im allgemeinen in der Reihenfolge Haare-Haarwurzeln-Haarwurzelscheiden zunimmt.

3. Der Lanthionin-, Cystin-, Zucker-, Aminosucker- und Lipidgehalt von Haaren, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden wurde bestimmt, um auf die Zusammensetzung der unlöslichen Anteile dieser Keratinsubstanzen schließen zu können.
4. Sowohl von behandelten als auch unbehandelten Haaren, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden wurden Aminosäureanalysen gemacht und die Abhängigkeit der Aminosäurezusammensetzung von der Behandlungsart untersucht.

Besonders erwähnenswert ist das Fehlen von Cystin in den Haarwurzelscheiden.

5. Die Proteine der Haare, Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden wurden durch Reduktion mit Kalium-thioglykolat und anschließende S-Carboxymethylierung mit Jodessigsäure in die SCMK-Proteine überführt und diskelektrophoretisch und säulenchromatographisch untersucht. Dabei hat sich gezeigt, daß alle von uns untersuchten Substanzen ein vielkomponentiges System darstellen.

6. Der SCMKA-Anteil von Haarwurzelscheiden und Haarwurzeln wurde an DEAE-Cellulose säulenchromatographisch in Fraktionen zerlegt und diese diskelektrophoretisch untersucht. Das Fandenmuster beider hat eine gewisse Ähnlichkeit. Je eine Fraktion zeigte schon ein hohes Maß an Einheitlichkeit. In dem Haarwurzelscheidenprotein gibt es eine Fraktion mit 25 Mol% Glutaminsäure und eine andere mit einem hohen Prozentsatz an Glycin, ohne daß auch gleichzeitig - wie bei Haar- und Haarwurzelkeratin - der Tyrosingehalt erhöht ist.

Literaturverzeichnis

1. A. Rich, F.H.C. Crick
The Structure of Collagen, in: Recent Advances in Gelatin
and Glue Research (Hrsgb. G. Stainsby)
Pergamon Press, London 1958
2. K. Kühn, W. Grassmann, U. Hofmann
Naturwissenschaften 47, 258 (1960)
3. Treatise on Collagen (Hrsgb. G.N. Ramachandran)
Academic Press, London N.Y. 1967
4. O. Röhm
Coll. 1913, 374
Gerber 1927, 23
5. J.C. Somerville
Jalca 58, (1963)
6. K. Rosenbusch
Leder 15 (1964)
16 (1965)
17 (1966)
7. F. Hahn und E. Heidemann
Leder 18 (1967)
8. W.T. Astbury und H.J. Woods
Phil. Trans. Roy. Soc. London Ser. A 232 (1933)
9. L. Pauling und R.B. Corey
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 37, 729 (1951)
39, 253 (1953)
10. R.D.B. Fraser, T.P. Macrae, E. Suzuki
Polymer. 10 (10), 810-826 (1969)
11. A.R.B. Skerthly
Nature 202, 161 (1964)
J. Textile Inst. 55, T 324 (1964)
12. P. Kassenbeck
Beitrag auf der Dritten Internationalen Wollforschungs-
konferenz in Paris, 1965
13. R.D.B. Fraser, T.P. Macrae, Millward
J. Textile Inst. 60 (18), 343-6 (1969)
14. J.B. Speakman
J. Soc. Chem. Ind. (London) 50, I (1931)
15. W.G. Crewter, L.M. Dowling, A.S. Inglis und J.A. Maclaren
Text.Res. J. 37 (9), 736-45 (1967)

16. W.G. Crewter
J. Polymer Sci. A2, 131 (1964)
A2, 149 (1964)
17. W.G. Crewter und L.M. Dowling
Biochim. Biophys. Acta 46, 605 (1961)
18. J.A. Maclaren, S.J. Leach und J.M. Swan
J. Textile Inst. 5 T 665 (1960)
19. G. Petermann
Unveröffentlichte Versuche, Inst.f.Mak. chem.
Abt. f. Eiweiss und Leder, T.H. Darmstadt (1968)
20. M.J. Horn, D.B. Jones und S.J. Ringel
J. Biol. Chem. 138, 141 (1941)
144, 87 (1942)
21. A. Schöberl
Biochem. Z. 313, 214 (1942)
22. W.R. Cuthbertson und H. Phillips
Biochem. J. 39, 7 (1945)
23. W.G. Crewter und L.M. Dowling
Proc. Third Int. Wool Text. Res. Conf., Paris (1965)
24. J.B. Speakman
Nature 132, 930 (1933)
J. Soc. Dyers Colourists 52, 335 (1936)
25. A. Schöberl
Ann. 507, III (1933)
Collegium 412 (1936)
Angew. Chem. 53, 227 (1940)
26. P. Mellet
Text. Res. J. 38 (10), 977-83 (1968)
27. P. Miro, Pedro, J.J. Garcia-Dominguez, J.J. Parra, J.L.
J. Soc. Dyers Colour 85(9), 407-10 (1969)
28. D.R. Goddard und L. Michaelis
J. Biol. Chem. 106, 605 (1934)
112, 361 (1935/36)
29. J.M. Gillespie und F.G. Lennox
Biochem. Biophys. Acta 12, 481 (1953)
30. P. Miro und Hueso
Text. Res. J. 38(7), 770-1 (1968)
31. P. Alexander und C.F. Earland
Nature 166, 396 (1950)
32. S. Blackburn
Biochem. J. 71, 13P (1959)
Biochem. Biophys. Acta 56, I (1962)

33. A.G. Matoltsy
Nature 201, 1130 (1964)
34. K.M. Rudall
Advances in Protein chem. 7, 253 (1952)
35. Carruthers, C.D. Woernly, A. Baumler und B. Kress
Proteins of Mammalian Epidermis
J. Invest. Dermatol (1955)
36. G.E. Rogers
Annals N.Y. Academy of Sci. 83, 408 (1959)
37. R.G. Crounse
Nature 200, 539 (1963)
38. H.B. Merrill
Industrial Engineering Chemistry, 1144 (1924)
36 (1925)
39. A. Kuntzel und T. Stirtz
Leder, 214 (1957)
40. W. Windus und J. S. Showell
Jalca 63, 258 (1968)
41. A.Simoncini L. Del Pezzo et G. Manzo
Proceedings of the IXth Conference of the Inter.
Union of Leather Chemists Societies, Imperial college
London 1969
42. K.A. Piez, E.A. Eigner, M.S. Lewis
Biochemistry 2, 58 (1963)
43. B. Schmidli
Helv. chim. Acta 38 (1955)
44. E. Heidemann, T. Yakali
Proceedings of the IXth Conference of the Inter. Union
of Leather Chemists Societies, Imperial college
London 1969
45. W.J. Ellis
Nature 18, 957 (1948)
46. R. Hauk
Jalca 53, 676-682 (1958)
47. G. Wagner
Diplomarbeit, T.H. Darmstadt 1968
48. M.X. Sullivan, C.F. Mijal
J. Am. Pharm. Assoc. 48, 324 (1959)
49. T.F. Spande, B. Witcop, Y. Degani und A. Patschornik
Advances in Protein Chemistry, 24, 119 (1970)

50. S. Blackburn, G.R. Lee
Proc. Intern. Wool Textile Res. Conf., Austr. 137 (1956)
51. G. Decroix, G. Mazinque
Bull. Inst. Textile 73, 41 (1958)
Bull. Trimestial Centre Controle Rech. Sci 38, 5 (1958)
52. P. Miro und J.J. Garcia-Dominquez
Mellian Textilberichte 47, 68 (1966)
53. L.M. Dowling und W.G. Crewter
Anal. Biochem. 8, 244 (1964)
54. E. Heidemann, F. Hahn und G. Wagner
Leder 19, 233 (1968)
55. D.W. Yemm, A.J. Willis
Biochem. J. 57, 508 (1954)
56. C.J. Randle und W.T.J. Morgan
Biochem. J. 61, 586 (1955)
57. E. Stahl
Dünnschichtchromatographie
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1967
58. S. Moore und W.H. Stein
Methods in Enzymology, 6, 819-831 (1963)
Hrsg. S.P. Colowick und N.O. Kaplan, New York, Academic Press
59. G.E. Rogers
Biochimica et Biophysica acta, 29, 33-43 (1958)
60. T. Karlson
Biochemie 7., neubearbeitete Auflage
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1970
61. W.G. Crewter, J.M. Gillespie, B.S. Harrap und A.S. Inglis
Biopolymers 4, 905-916 (1966)
62. P.J. Reis und P.G. Schinkel
Aust. J. Biol. Sci. 16, 218 (1963)
63. J.M. Gillespie, P.J. Reis und P.G. Schinkel
Aust. J. Biol. Sci. 17, 548-60 (1964)
64. Y. Shechter, J.W. Landau und V.D. Newcomer
The Journal of Investigative Dermatology 52, 57-62 (1969)
65. J. Ellis, J.M. Gillespie und Lindley
Nature 165, 545-548 (1950)
66. E.J. Miller, J.M. Lane und K.A. Piez
Biochemistry 8, 30 (1969)
67. W. Heinrich
Dissertation T.H. Darmstadt 1970

68. M. Lange
Dissertation T.H. Darmstadt 1970
69. L. Ornstein
Annals N.Y. Acad. Sci. 121, 321 (1964)
70. B.J. Davis
Annals N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964)
71. H.R. Maurer
Disk-Elektrophorese, Walter de Gruyter, Berlin 1968
72. O.P. Thompson und I.J. O'Donnell
Aust. J. Biol. Sci. 17, 271-81 (1964)
73. I.J. O'Donnell und O.P. Thompson
Aust. J. Biol. Sci. 17, 973 (1964)
74. H.P. Lundgren, W.H. Ward
Ultra structure of Protein Fibers
Hrsgb. R. Borasky, Academic Press, New York 1963
75. I.J. O'Donnell, E.O.P. Thompson
Aust. J. Biol. Sci. 15, 740-755 (1962)
76. H. Determann
Gelchromatographie, Springer Verlag Berlin 1967
77. H.W. Bernhard
Dissertation T.H. Darmstadt 1968
78. B.S. Harrap
Aust. J. Biol. Sci. 15, 596 (1962)
79. B.S. Harrap
Aust. J. Biol. Sci. 16, 231 (1963)
80. J.M. Gillespie
Aust. J. Biol. Sci. 16, 241-249 (1963)
81. J.M. Gillespie und B.S. Harrap
Aust. J. Biol. Sci., 16, 252 (1963)
82. K.A. Piez
Anal. Biochem. 26, 305 (1968)
83. O.P. Thompson und I.J. O'Donnell
Aust. J. Biol. Sci. 13, 393 (1960)
84. I.J. O'Donnell und O.P. Thompson
Aust. J. Biol. Sci. 14, 461 (1961)
85. O.P. Thompson und I.J. O'Donnell
Aust. J. Biol. Sci. 15, 757 (1962)
86. O.P. Thompson und I.J. O'Donnell
Aust. J. Biol. Sci. 17, 277 (1963)

87. O.P. Thompson und I.J. O'Donnell
Aust. J. Biol. Sci. 18, 1207 (1965)
88. A.G. Matoltsy und C.A. Balsamo
J. Biophys. Biochem Cytol. I, 339 (1955)
89. M.S.C. Birbeck, E.H. Mercer
J. Biophys. Biochem. Cytol III, 203 (1957)
90. H.S. Mason
The Toilet Goods Association 48, 7 ff (1967)
91. C. Iancu
Unveröffentlichte Arbeit, Inst.f. Makromolekulare Chemie -
Eiweiß und Leder, T.H. Darmstadt (1970)

L e b e n s l a u f

Am 31.10.1940 wurde ich in Akhisar/Manisa/Türkei als Sohn des Mehmet Yakalı und dessen Ehefrau Fatma, geb. Özkök, geboren.

Nach der Grund- und Mittelschulzeit in Izmir besuchte ich von 1956 - 1959 in der gleichen Stadt das Gymnasium, an dem ich im Oktober 1959 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1959-1960 begann ich mit meinem Landwirtschaftlichen Studium an der Ege-Universität in Izmir und legte mein Diplomexamen an der gleichen Fakultät im Wintersemester 1963 ab.

Vom 1.4.1964 bis zum 31.3.1966 erfüllte ich meine Militärpflicht. Ich wurde als Leutnant aus dem Dienst entlassen.

Seit dem Sommersemester 1966 bin ich am Institut für Fasertechnologie der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Izmir wissenschaftlicher Assistent.

Im Juni 1967 bekam ich ein Stipendium vom Deutschen Akademischen Austauschdienst und kam nach Deutschland, um zu promovieren. Bevor ich mit meiner Doktor-Arbeit anfang, war ich 4 Monate am Goethe-Institut in Lüneburg und erweiterte meine Deutschkenntnisse.

Vom 1. Oktober 1967 bis Dezember 1970 fertigte ich nach Vereinbarung mit der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Gießen und dem Institut für Makromolekulare Chemie, Abteilung Eiweiß und Leder an der Technischen Hochschule Darmstadt als auswärtiger Doktorand des Institutes für Tierernährung der Universität Gießen meine Doktor-Arbeit am Institut für Makromolekulare Chemie, Abteilung Eiweiß und Leder an.

